

**Avaliação de técnicas de estudo cromossómico de
produtos de abortamento:**

**Citogenética Convencional *versus* Biologia
Molecular (MLPA e QF-PCR)**

Dissertação apresentada à Faculdade de
Engenharia da Universidade do Porto
com vista à obtenção do Grau de
Mestre em Engenharia Biomédica.

Orientador: Professor Doutor Sérgio Castedo
(Faculdade de Medicina da Universidade do Porto)

Ana Vaz Canavarro Portocarrero de Carvalho

2009

ÍNDICE GERAL

ÍNDICE DE FIGURAS/TABELAS/GRÁFICOS/DIAGRAMAS	4
<i>Resumo</i>	8
<i>Abstract</i>	9
GLOSSÁRIO/ABREVIATURAS	10
 I INTRODUÇÃO	 14
1. Divisão celular	15
1.1 Os cromossomas	15
1.2 Interfase	19
1.3 Mitose	20
1.4 Meiose	21
2. Anomalias Cromossómicas	23
2.1 Anomalias Numéricas	25
2.2 Anomalias Estruturais	28
3. Citogenética de abortos espontâneos	35
4. Aborto Recorrente	38
5. PCR	40
5.1 QF-PCR	43
6. MLPA	46
 II OBJECTIVO	 49
 III MATERIAIS E MÉTODOS	 51
1. Material Biológico	52
2. Técnicas	53
2.1 Citogenética convencional – Cariótipo	53
2.2 Técnicas de Biologia Molecular – MLPA + QF-PCR	53
3. Análise de dados	60
4. Análise estatística	60

IV RESULTADOS	61
1. Citogenética convencional - Cariótipo	62
2. Biologia molecular - MLPA + QF-PCR	62
3. Indicações clínicas	70
V DISCUSSÃO DE RESULTADOS E CONCLUSÃO	76
1. Citogenética convencional	77
2. Técnicas de Biologia Molecular	78
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84
ANEXOS	92

ÍNDICE DE FIGURAS / TABELAS / GRÁFICOS / DIAGRAMAS

FIGURAS

Figura 1 – Exemplo de cariótipo humano (46,XY)	17
Figura 2 – Esquema exemplificativo de um Cromossoma	18
Figura 3 – Tipos de cromossomas segundo a posição do centrómero	18
Figura 4 – Fases do ciclo celular	19
Figura 5 – Mecanismo de <i>crossing-over</i>	22
Figura 6 – Esquemas exemplificativos dos mecanismos de Mitose e Meiose	24
Figura 7 – Cariótipo de uma trissomia 21 (Síndrome de Down – 47,XY,+21)	26
Figura 8 – Esquema exemplificativo dos mecanismos de não-disjunção em Meiose I e II: não-disjunção de homólogos em Meiose I e não-disjunção de cromátides-irmãs em Meiose II	27
Figura 9 – Esquema exemplificativo de translocação recíproca entre os cromossomas 4 e 20	29
Figura 10 – Esquema exemplificativo de uma inversão paracêntrica e de uma pericêntrica	29
Figura 11 – Esquema exemplificativo de uma inserção intercromossômica (do cromossoma 4 no cromossoma 20)	30
Figura 12 – Esquema exemplificativo de uma deleção intersticial	30
Figura 13 – Esquema exemplificativo de uma duplicação	31
Figura 14 – Esquema exemplificativo de um isocromossoma	31
Figura 15 – Modos de segregação	33
Figura 16 – Esquema representativo de dois ciclos de reacção de PCR	41
Figura 17 – Resultado de uma electroforese	42
Figura 18 – Representação esquemática da detecção de trissomias utilizando STR's específicos e a técnica de QF-PCR	44
Figura 19 – Comparação da MLPA com outras técnicas	46
Figura 20 – Esquema exemplificativo de MLPA	47
Figura 21 – Resultados de uma análise: ADN controlo (em cima) e ADN com deleção do exão 13	48

TABELAS

Tabela 1 – Número de cromossomas de algumas espécies diplóides	16
Tabela 2 – Mecanismos de não-disjunção dos cromossomas X, 13, 16, 18 e 21	28
Tabela 3 – Frequência de anomalias cromossómicas em abortos espontâneos	35
Tabela 4 – Abortos espontâneos – efeito do aumento da idade materna na incidência de anomalias cromossómicas	36
Tabela 5 – Frequência (%) e probabilidade de sobrevivência (%) de trissomias e monossomia X	37
Tabela 6 – Resultados por citogenética convencional (cariótipo)	64

Tabela 7 – Resultados por Biologia Molecular: MLPA e QF-PC	67
Tabela 8 – Avaliação estatística da diferença na detecção de anomalias entre técnicas de citogenética convencional e biologia molecular (Teste Chi Quadrado)	68
Tabela 9 - Número de casos com cariótipo anormal por citogenética convencional que seriam detectáveis/não detectáveis por MLPA e/ou QF-PCR	69
Tabela 10 - Número de casos com cariótipo anormal por citogenética convencional e indicações de Aborto Espontâneo, Anomalias Fetais e Idade Materna Avançada que seriam detectáveis/não detectáveis por MLPA e/ou QF-PCR	69
Tabela 11 – Comparação da frequência de anomalias encontradas com as descritas na literatura	73
Tabela 12 – Comparação das frequências das principais trissomias encontradas em abortos espontâneos com as descritas na literatura	73
Tabela 13 – Em abortos espontâneos - Avaliação estatística da diferença na detecção de anomalias cromossômicas entre as técnicas de citogenética convencional e de biologia molecular (Teste Chi Quadrado)	74
Tabela 14 - Em abortos espontâneos - Avaliação estatística da diferença na detecção das anomalias cromossômicas identificadas quer por técnicas de citogenética convencional quer por biologia molecular	75
Tabela 15 - Avaliação estatística da diferença na detecção de anomalias identificadas por técnicas de citogenética convencional e de biologia molecular, em aborto espontâneo (Teste Chi Quadrado)	93
Tabela 16 – Avaliação estatística da diferença de detecção de trissomias 13 entre as técnicas de citogenética convencional e de biologia molecular, em aborto espontâneo (Teste Chi Quadrado)	94
Tabela 17 – Avaliação estatística da diferença na detecção de trissomias 18 entre as técnicas de citogenética convencional e de biologia molecular, em abortos espontâneos (Teste Chi Quadrado)	95
Tabela 18 – Avaliação estatística da diferença na detecção de trissomias 21 entre as técnicas de citogenética convencional e de biologia molecular, em aborto espontâneo (Teste Chi Quadrado)	96
Tabela 19 – Avaliação estatística da diferença na detecção de monossomia X entre as técnicas de citogenética convencional e de biologia molecular, em aborto espontâneo (Teste Chi Quadrado)	97
Tabela 20 - Avaliação estatística da diferença de detecção de poliploidias entre as técnicas de citogenética convencional e de biologia molecular, em aborto espontâneo (Teste Chi Quadrado)	98

GRÁFICOS

Gráfico 1 – Resultados obtidos por citogenética convencional	63
Gráfico 2 – Proporção de anomalias cromossômicas encontradas por citogenética convencional	63
Gráfico 3 – Resultados obtidos por MLPA/QF-PCR	66
Gráfico 4 – Proporção de anomalias cromossômicas encontradas por MLPA/QF-PCR	66

DIAGRAMAS

Diagrama 1 – Número de casos sem crescimento celular estudados por técnicas de biologia molecular e resultados respectivos	68
Diagrama 2 – Número de casos sem crescimento celular e com indicação de Aborto Espontâneo que foram estudados por técnicas de biologia molecular e resultados respectivos	71
Diagrama 3 – Número de casos sem crescimento celular e com indicação de Anomalias Fetais que foram estudados por técnicas de biologia molecular resultados respectivos	71
Diagrama 4 – Número de casos sem crescimento celular e com indicação de Idade Materna Avançada que foram estudados por técnicas de biologia molecular e resultados respectivos	72

Resumo

Na procura das causas de morte fetal, sabendo que 15% - 20% das gravidezes clinicamente reconhecidas terminam em aborto espontâneo (Kajii *et al.*, 1980), o estudo dos produtos de abortamento torna-se da maior importância.

Sabendo que as alterações cromossômicas têm uma presença considerável nas causas de aborto, o estudo citogenético é, ainda, a primeira opção na avaliação destas alterações, por permitir detectar, para além de anomalias cromossômicas numéricas (as mais frequentes entre os cariótipos anormais nestes tecidos), anomalias estruturais (equilibradas e desequilibradas). No entanto, esta técnica envolve a cultura de células, que no caso dos produtos de abortamento está frequentemente associada ao insucesso [10% a 40% (Lomax *et al.*, 2000; Fritz *et al.*, 2001)].

Nessa situação de falência de cultura, é possível recorrer a técnicas de biologia molecular: MLPA (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*) e QF-PCR (*Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction*), as quais permitem a detecção rápida de anomalias cromossômicas numéricas.

Entre outras, estas técnicas estão a ser amplamente estudadas, quer em Diagnóstico Pré-Natal na pesquisa de aneuploidias com resultados mais rápidos (Adinolfi *et al.*, 1997; Cirigliano *et al.*, 2001; Slater *et al.*, 2003; Nicolini *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2006; Waters *et al.*, 2006, 2007; Shaffer, 2007; Kooper *et al.*, 2008), quer ao nível do estudo de produtos de abortamento na procura da superação do insucesso da cultura celular (Diego-Alvarez *et al.*, 2005, 2007; Bruno *et al.*, 2006). A utilização destes testes de modo isolado, embora alguns autores já os considerem suficientemente eficientes, não é ainda prática de rotina em nenhum laboratório.

Abstract

When looking for the causes of foetal death, and knowing that 15% - 20% of clinically recognised pregnancies end in spontaneous abortion (Kajii et al., 1980), the study of the products of abortion is quite important.

Since chromosomal changes are often indicated as a cause of abortion a cytogenetic study is still the first option for assessing these changes. It may detect both numerical chromosomal abnormalities (the commonest in abnormal karyotypes in these tissues) and structural aberrations (balanced and unbalanced). But this technique involves cell culture and this often fails for abortuses [**10% a 40%** (Lomax *et al.*, 2000; Fritz *et al.*, 2001)].

Where cell culture is unsuccessful molecular biological techniques may be useful: MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification) and QF-PCR (Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction), which can quickly detect numerical chromosomal abnormalities.

These techniques, and others, have been widely studied in different areas. First, they are employed in prenatal diagnostics in the search for aneuploidy to obtain swift results (Adinolfi et al., 1997; Cirigliano et al., 2001; Slater et al., 2003; Nicolini et al., 2004; Allen et al., 2006; Waters et al., 2006, 2007; Shaffer, 2007; Kooper et al., 2008); They have also been used to study the products of abortion in efforts to overcome cell culture failure (Diego-Alvarez et al., 2005, 2007; Bruno et al., 2006), which this work addresses. The use of these tests on their own is not yet routine practice in any laboratory, even though some authors do consider them to be efficient enough.

GLOSSÁRIO/ABREVIATURAS

Aborto/Abortamento – expulsão espontânea ou induzida do embrião ou do feto

ADN – ácido desoxirribonucleico

AKE – solução tampão (Cloreto Amónio – NH_4Cl , Hidrogenocarbonato de Potássio – KHCL_3 e EDTA)

Alelos – forma alternativa de um gene, num mesmo *locus* de um par de cromossomas homólogos, sendo um de origem materna e o outro de origem paterna

AM - amelogenina

ARN – ácido ribonucleico (**mARN** – ARN mensageiro)

Autossomas – todos os cromossomas humanos (#1 ao #22, com a excepção dos sexuais (X e Y)

Blastocisto – estrutura formada durante a embriogénese (70-100 células)

bp – pares de bases

Cariótipo – conjunto de cromossomas característicos de uma espécie biológica

Citogenética – ramo da genética que estuda os cromossomas

CGH – *comparative genomic hybridisation*

Cromossoma – estrutura organizada contendo ADN, proteínas, elementos reguladores e outras sequências nucleotídicas

Cromossomas homólogos – elementos de um par de cromossomas idênticos, um com origem materna e o outro com origem paterna

dNTP - desoxirribonucleotídeos

Diploidia (2n) – número característico de cromossomas nas células somáticas, que corresponde a duas cópias de cada cromossoma (na espécie humana $2n=46$, 23 pares de cromossomas)

DPN – Diagnóstico Pré-Natal

EDTA – ácido etilenodiaminotetraacético

Electroforese – técnica de separação de moléculas por meio de corrente eléctrica de acordo com a carga, tamanho e/ou forma

Eucariota – célula ou organismo em que o núcleo está envolvido por membrana nuclear e que apresenta organelos celulares

Exão – região do gene que é transcrita

Fenótipo – características físicas, bioquímicas e/ou fisiológicas observadas, resultantes da interação do meio ambiente com um ou vários genes

FISH – *fluorescent in situ hybridisation*

Gâmeta – célula reprodutiva madura (ovócito e espermatozóide), com um número haplóide (n) de cromossomas

Gametogénese – mecanismo de formação dos gâmetas (divisão celular)

Genoma – todo o componente genético, haplóide ou diplóide

Haploidia (n) – situação em que uma célula contém metade do número característico de cromossomas de uma espécie (ex: gâmetas)

Heterozigotia – ocorrem dois alelos diferentes num mesmo *locus* de um par de cromossomas homólogos

Homozigotia – ocorrem dois alelos idênticos num mesmo *locus* de um par de cromossomas homólogos

Kb - kilobases

Locus – local de um cromossoma onde se encontra um gene (plural: *loci*)

Mb - Megabases

MgCl₂ – cloreto de magnésio

mix – mistura; conjunto de sondas (sequências conhecidas de ADN) – *probe-mix* - e/ou enzimas e/ou reagentes, construído artificialmente

MLPA – *multiplex ligand-probe amplification*

Mosaicismo – presença, no mesmo indivíduo, de duas ou mais linhas celulares provenientes de um mesmo zigoto com genótipo ou cariótipo diferente

Nucleotídeos – moléculas constituídas por um nucleosídeo (açúcar (ribose ou desoxirribose) + base azotada) e um grupo fosfato, cuja polimerização dá origem à cadeia de ADN ou ARN

Oligonucleotídeos – sequência curta (20-40) de nucleotídeos

Oogénese – processo de formação de gâmetas femininos

PCR – *polymerase chain reaction*

Polimorfismo – variação genética resultante da existência de diferentes alelos, num *locus*, numa população

QF-PCR – *quantitative-fluorescent polymerase chain reaction*

rpm – rotações por minuto

STR – *short tandem repeats*

TAMRA – corante fluorescente

tris-HCL – hidrocloreto tris (hidroximetil)aminometano

Zigoto – célula diplóide resultante da fecundação de um gameta feminino por um gameta masculino

(Adaptado de Regateiro FJ, 2003)

I INTRODUÇÃO

No sentido de avaliar o interesse da utilização das técnicas de biologia molecular no estudo cromossómico de produtos de abortamento em casos de insucesso de cultura celular, finalidade a que este trabalho se propõe, existem conceitos e mecanismos que deverão, primeiramente, ficar esclarecidos.

1. DIVISÃO CELULAR

1.1 OS CROMOSSOMAS

O processo de divisão celular das células somáticas é conhecido por *mitose* (*mitos* – filamento), devido ao aparecimento de filamentos que se vão condensando e que se coram intensamente, os chamados *cromossomas* (*croma* – cor; *soma* – corpo).

O nome cromossoma foi inicialmente utilizado para designar as estruturas coradas que se tornam aparentes na mitose de células eucarióticas. Hoje em dia, este termo designa uma unidade morfológica e fisiologicamente activa, visível ou não ao microscópio, que contém a informação genética, independentemente do estado de condensação. Os cromossomas localizam-se no núcleo¹, são constituídos por uma molécula de ADN (genes, elementos reguladores e outras sequências nucleotídicas) e proteínas associadas, e representam porções de *cromatina* mais ou menos condensada, com morfologia e número específico e constante para cada espécie (Tabela 1).

A molécula de ADN pode ser circular ou linear, sendo esta a forma presente nas células eucarióticas (excluindo os cromossomas mitocondriais, já que estes são também circulares).

¹ as células podem conter mais do que um tipo de cromossomas, por exemplo na organização do ADN mitocondrial (na maioria das células eucarióticas) e nos cloroplastos (nas células vegetais)

Tabela 1 – Número de cromossomas de algumas espécies diplóides (2n) [1]

Espécie	Nº Total de Cromossomas (2n)	Espécie	Nº Total de Cromossomas (2n)
Centeio	14	Ervilha	14
Drosófila	8	Borboleta	380
Caracol	24	Minhoca	32
Galo	78	Pomba	16
Porco	40	Cavalo	64
Humano	46	Chimpanzé	48

As proteínas permitem o suporte da estrutura dos cromossomas e algumas, as *histonas*, apresentam um grau de conservação tal que as diferenças entre elas em espécies como o ser humano e a ervilha-doce são muito pequenas, o que mostra a importância destes elementos em processos vitais da célula (provavelmente na manutenção da integridade da estrutura dos cromossomas).

A cromatina compõe-se, então, de ADN e proteínas e pode apresentar diferentes graus de condensação, aparecendo na sua forma menos condensada, a *eucromatina*, ou na mais condensada, a *heterocromatina*, que se divide em heterocromatina constitutiva e heterocromatina facultativa. A eucromatina contém a parte codificante do ADN, os genes, enquanto a heterocromatina contém ADN não-codificante (heterocromatina constitutiva, que geralmente contém sequências repetitivas) ou inactivo (heterocromatina facultativa, que por vezes se expressa).

O estudo morfológico dos cromossomas mostrou que, no núcleo das células somáticas eucariontes, existem duas cópias de cada um (salvo o caso dos cromossomas sexuais no sexo masculino) – *cromossomas homólogos* - pelo que estas se classificam como *diplóides* (2n). Quando, como é o caso dos gametas, as células apresentam apenas um exemplar de cada cromossoma (n), designam-se *haplóides* (*aploos*, simples; *eidos*, forma).

Ao conjunto de cromossomas característicos de uma espécie biológica dá-se o nome *cariótipo* (Figura 1), cuja identificação inclui o número de cromossomas e a indicação

dos cromossomas sexuais (XX - feminino; XY – masculino), para além de quaisquer informações extra a relevar.

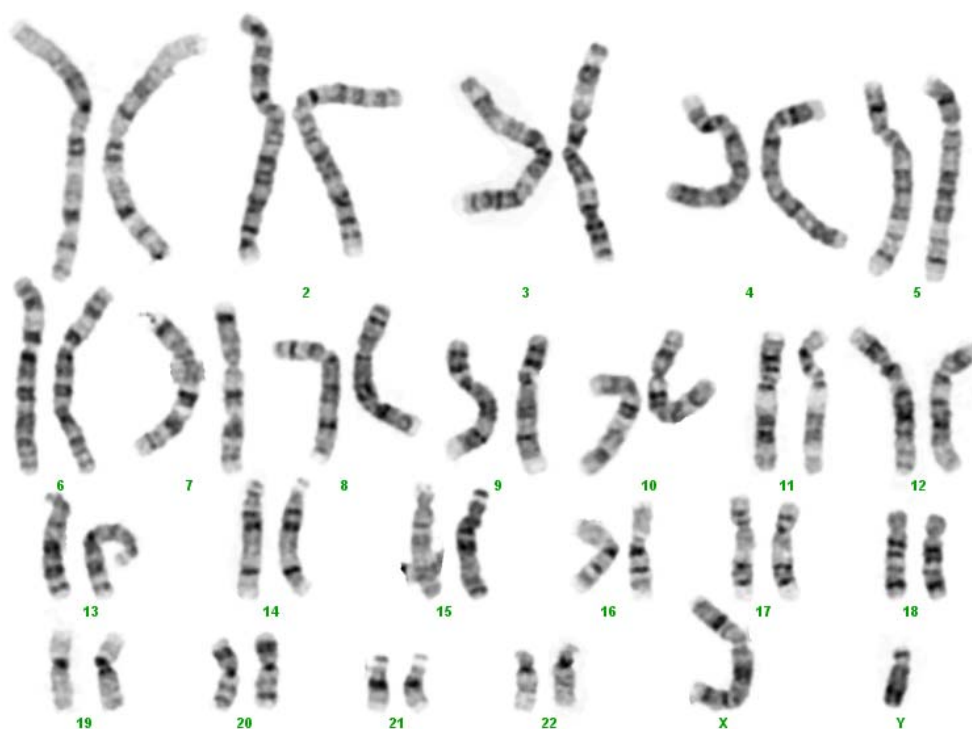


Figura 1 – Exemplo de cariótipo humano (46,XY)

As técnicas de bandeamento cromossómico definem padrões de bandas específicos para cada cromossoma e intercalam bandas escuras com bandas mais claras, consoante a sua afinidade para a coloração. Esta distinção é devida à diferente composição em bases nucleotídicas, ao tempo do ciclo em que ocorre a replicação, à conformação do cromossoma e ao número de genes e sequências repetitivas (Regateiro FJ, 2003).

As extremidades dos cromossomas são constituídas por regiões ricas em sequências conservadas de ADN contendo repetições da sequência TTAGGG, que se julga terem um papel importante na prevenção da união entre cromatinas de cromossomas diferentes – os *telómeros* (Figura 2).

Durante o ciclo celular, os cromossomas variam na sua estrutura, podendo aparecer na sua forma simples e linear ou duplicados (neste caso as cópias - *cromátides* - são unidas pelo *centrómero*). O centrómero localiza-se numa região estreitada do cromossoma (Figura 2), dividindo-o em duas partes - o braço curto *p* e o braço longo *q*. Este estreitamento (também designado por *constricção primária*) adquire um papel importante nos movimentos mitóticos do cromossoma, servindo como ponto de inserção dos microtúbulos do fuso mitótico.

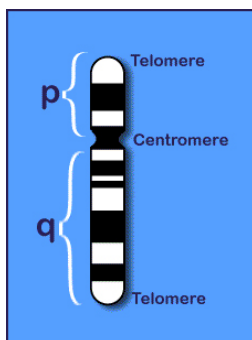
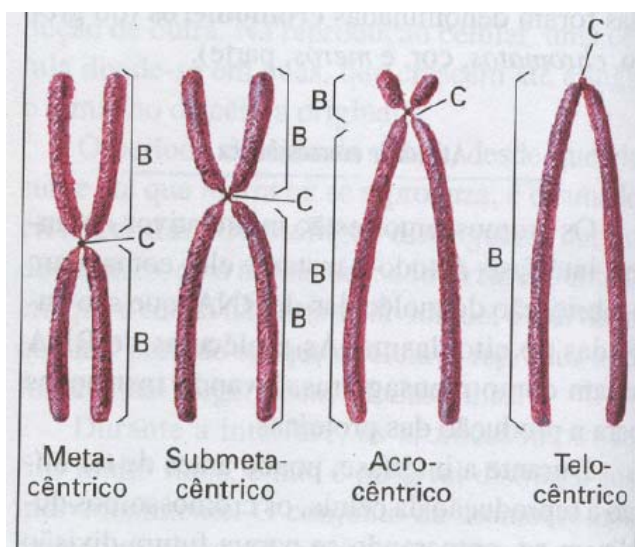


Figura 2 – Esquema exemplificativo de um Cromossoma [2]

De acordo com a posição do centrómero, os cromossomas dividem-se em quatro tipos fundamentais (Figura 3):

- *telocêntricos*, o centrómero situa-se na região terminal do cromossoma;
- *acrocêntricos*, o centrómero é sub-terminal;
- *submetacêntricos*, o centrómero divide o cromossoma em braços desiguais;
- *metacêntricos*, o centrómero divide o cromossoma em braços iguais.

Na espécie humana não existem cromossomas telocêntricos!



B – braço do cromossoma

C - centrómero

Figura 3 – Tipos de cromossomas segundo a posição do centrómero [3]

1.2 INTERFASE

A mitose, ou *Fase Mitótica* (Fase M), corresponde, nas células somáticas, a uma das fases do ciclo celular que envolve a divisão do núcleo, e consequente equidistribuição do material genético nuclear por duas células-filhas, e a divisão do citoplasma num processo que se designa por *citocinese* (*cytos*, célula; *cinesis*, movimento).

A outra etapa do ciclo de divisão celular é conhecida por **interfase** e compreende a duplicação dos componentes da célula-mãe. Como os cromossomas estão pouco condensados e dispersos pelo núcleo, nesta etapa não são visíveis ao microscópio óptico. Este processo estende-se por um período que vai desde o fim de uma divisão celular até ao início da divisão seguinte e distingue-se em três fases (Figura 4):

1 - *Período G1* (G de *gap* - intervalo) ou *pós-mitótico*

Fase de crescimento celular, com intensa actividade biossintética (síntese de ARN e proteínas) e aumento do citoplasma.

2 - *Período S* (S de *synthesis* – síntese)

É a etapa mais bem definida da interfase, em que ocorre a duplicação do ADN, por replicação semi-conservativa. No fim desta fase, cada cromossoma passa a ser constituído por duas cromátides unidas por um centrómero.

3 - *Período G2* ou *pré-mitótico*

Estende-se desde o final da síntese de ADN até ao início da mitose seguinte e aqui têm lugar vários processos necessários para a próxima divisão, tais como a síntese de biomoléculas e das proteínas tubulina, actina e miosina.

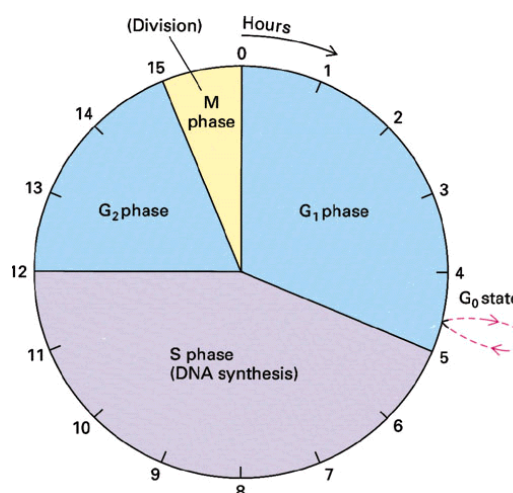


Figura 4 — Fases do ciclo celular [4]

1.3 MITOSE

A divisão do núcleo envolve processos que vão levar a diferentes transformações na célula e desenvolve-se em quatro fases.

1 - *Profase*

Caracteriza-se pela condensação gradual da cromatina interfásica, ficando os cromossomas mais pequenos, espessos e visíveis ao microscópio óptico.

É nesta fase que se observa o início da formação do *fuso mitótico* ou *fuso acromático*, um conjunto de microtúbulos que se estendem entre os pólos da célula e vão ter a função de conduzir os cromossomas na sua migração aos pólos opostos, durante a anafase.

Esta etapa termina com a desorganização completa dos nucléolos e a fragmentação da membrana nuclear.

2 - *Metafase*

A condensação dos cromossomas progride activamente nesta fase. Os microtúbulos, que se inserem nos *cinetocoros* (pequena estrutura situada no centrómero que contém as proteínas necessárias à ligação dos microtúbulos), concluem a formação do fuso acromático e, devido à actividade destes sistemas microtubulares, os cromossomas dispõem-se no plano central da célula, com as cromátides orientadas para cada um dos pólos e os centrómeros no centro, formando a placa equatorial.

3 – *Anafase*

Ocorre a quebra do equilíbrio metafásico com a ruptura dos centrómeros e consequente separação das cromátides irmãs (cromossomas-filhos). Inicia-se a migração das cromátides para cada um dos pólos opostos das células, por acção do encolhimento dos microtúbulos do fuso acromático – *migração polar*.

No final desta fase, cada pólo apresenta o mesmo número de cromossomas, contendo todo o material genético da célula-mãe, mas apenas com uma cromátide.

4 – *Telofase*

Caracteriza-se pela organização das membranas nucleares e consequente formação de duas futuras células distintas, as células-filhas. Observa-se a descondensação da cromatina, a reorganização dos nucléolos, a reconstituição da membrana nuclear e o desaparecimento do fuso mitótico. Nesta fase ocorre a citocinese.

Com este mecanismo de divisão celular, cada célula-filha recebe o mesmo número de cromossomas e a mesma informação genética da célula-mãe (Figura 6).

1.4 MEIOSE

A reprodução sexuada é caracterizada pela união de dois gametas (um masculino e um feminino), num processo denominado fecundação.

A formação dos gametas ocorre através de um tipo singular de divisão celular a que se dá o nome de *meiose* (*meion*, menor). Nesta, uma célula com um conjunto diplóide (**2n**) de cromossomas dá origem a quatro células de número haplóide (**n**), altamente especializadas, os gametas (Figura 6).

A meiose conduz, então, à redução para metade do número de cromossomas e quantidade de ADN através de duas divisões - meiose I e meiose II - sem que ocorra síntese de ADN (duplicação do material genético) entre as divisões.

Meiose I

Envolve quatro etapas (Profase I, Metafase I, Anafase I e Telofase I) e termina na formação de duas células-filhas.

1 - Profase I

É a fase mais longa e complexa da meiose e pode representar 85% - 95% do tempo total desta divisão.

Compreende 5 passos:

– Leptóteno

Nesta fase ocorre a condensação dos cromossomas e aproximação dos homólogos, o nucléolo ainda está presente e as cromátides ainda não são visíveis ao microscópio.

– Zigóteno

Ocorre o emparelhamento dos cromossomas homólogos – *sinapse* – com a formação da *tétrada cromatídica* ou *bivalente* ou *díada cromossómica*.

– Paquíteno

Os cromossomas atingem nesta etapa o grau máximo de condensação; ocorre a formação dos *pontos de quiasma*, locais onde se dá troca de material genético entre homólogos [*crossing-over*] (Figura 5).

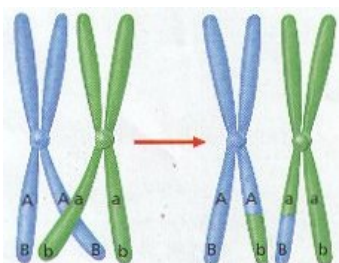


Figura 5 – Mecanismo de *crossing-over* [5]

– Diplóteno

Nesta fase, os cromossomas homólogos começam a afastar-se, evidenciando os pontos de *quiasma*, que, à medida que o afastamento se desenvolve, vão deslizando para a extremidade dos cromossomas.

– Diacinese

É a última etapa da Profase I e aqui ocorre a separação completa dos homólogos.

Durante a Profase I, a cromatina condensa-se sob a forma de cromossomas visíveis ao microscópio, o nucléolo desaparece e a membrana nuclear é desorganizada. É nesta fase que ocorre o *crossing-over*, troca de segmentos entre cromátides-irmãs.

2 - Metafase I

Os bivalentes dispõem-se no plano central da célula, cada homólogo com o centrómero apontado para pólos opostos e os pontos de *quiasma* alinhados na placa equatorial.

3 - Anáfase I

Ocorre a *segregação dos homólogos*: a tétrada cromatídica é desfeita e os cromossomas migram para os pólos opostos da célula, por acção dos microtúbulos do fuso acromático. Ao contrário do que se passa na mitose, as cromátides-irmãs permanecem juntas e os centrómeros inalterados.

4 - Telofase I

Os cromossomas chegam aos pólos, descondensam, formam dois núcleos e ocorre a citocinese, com a formação de duas células haplóides.

A passagem da primeira para a segunda divisão da meiose é um processo extremamente rápido, já que não ocorre interfase com a duplicação de ADN.

Meiose II

A segunda divisão da meiose é em tudo semelhante à mitose, envolvendo os mesmos quatro passos.

1 - Profase II

Os cromossomas voltam a condensar, ocorrendo a desorganização da membrana nuclear e o início da formação do fuso acromático.

2 - Metafase II

Os cromossomas dispõem-se no plano equatorial da célula com os centrómeros alinhados no centro desse plano e as cromátides orientadas cada uma para seu pólo.

3 - Anafase II

Quebram-se os centrómeros e dá-se a migração de cada cromátide para pólos opostos.

4 - Telofase II

Os cromossomas atingem os pólos da célula, descondensam e a membrana nuclear reorganiza-se em torno de cada conjunto. No final desta fase dá-se a citocinese e formam-se quatro células-filhas haplóides, cada uma com um cromossoma de cada par homólogo.

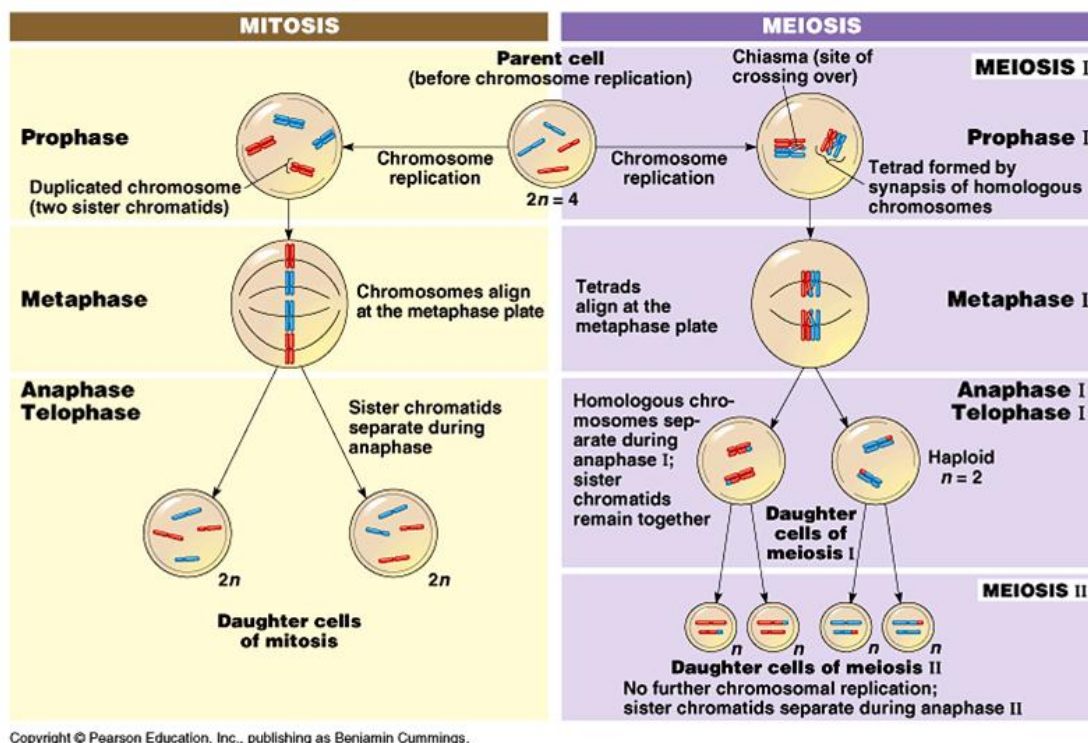


Figura 6 – Esquemas exemplificativos dos mecanismos de Mitose e Meiose [6]

A importância da meiose é bem evidente na formação de células germinativas com metade do número de cromossomas das células somáticas. Com o objectivo da reprodução sexuada, esta divisão mostra-se fundamental, permitindo que se mantenha constante o número de cromossomas de geração em geração.

A recombinação genética (*crossing-over*) em meiose I e a ascensão aleatória dos cromossomas são dois factores geradores de variabilidade e diversidade genética entre organismos.

(Stansfield, 1998; Junqueira, 1987)

2. ANOMALIAS CROMOSSÓMICAS

As anomalias cromossômicas podem ser numéricas ou estruturais e são responsáveis por diversas síndromes, diferentes fenótipos e por cerca de 50% - 60% dos casos de aborto espontâneo do primeiro trimestre.

A maioria destas anomalias deve-se a erros nos processos de divisão celular, mais especificamente nas duas divisões da meiose. Estes erros podem, assim, levar à formação de gametas desequilibrados e, conseqüentemente, a um zigoto desequilibrado – *anomalia constitucional*.

2.1 ANOMALIAS NUMÉRICAS

As anomalias numéricas, as *aneuploidias*, representam erros no número de cromossomas e podem dividir-se em:

- **Trissomias** – existem três cópias de um determinado cromossoma, ficando o número total de cromossomas igual a 47 (Figura 7);
- **Monossomias** – existe apenas uma cópia de um determinado autossoma ou apenas um cromossoma sexual, ficando o número total de cromossomas igual a 45;
- **Poliploidias** – existe uma multiplicação do número total de cromossomas. Ex: *Triploidia* – existem três cópias de cada cromossoma, $3n=69$ cromossomas.

A perda de material genético, a monossomia, é geralmente menos tolerada do que o ganho de material, a trissomia. O tipo de fenótipos que advém destes erros é de gravidade variada, dependendo do cromossoma envolvido.

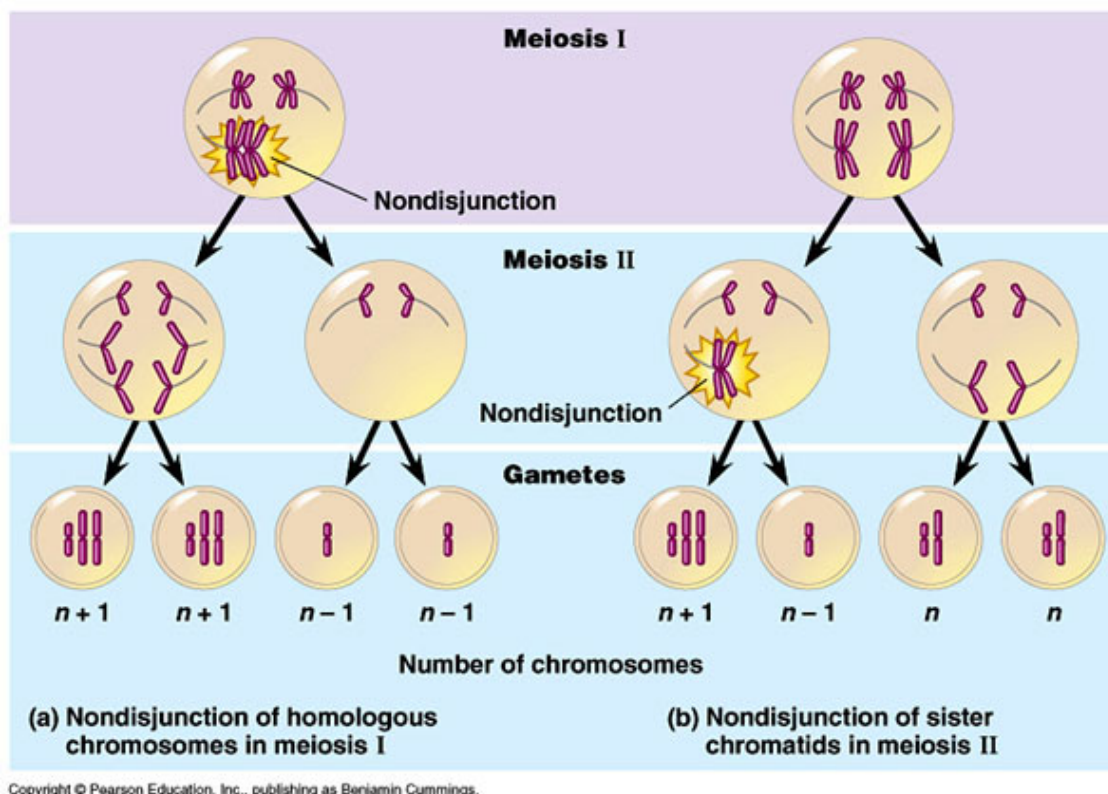
(Gardner, 2004)



Figura 7 – Cariótipo de uma trissomia 21 (Síndrome de Down – 47,XY,+21)

As causas mais comuns para a ocorrência de anomalias numéricas são os erros de divisão celular designados por *não-disjunção* (Figura8). A não-disjunção define-se como a incapacidade de cromossomas homólogos se separarem simetricamente durante a divisão celular. Esta situação pode ocorrer nos diferentes tipos de divisão celular: em mitose, sendo a principal causa de mosaicos – indivíduos constituídos por duas linhas celulares geneticamente diferentes provenientes do mesmo zigoto - , e em meiose (I e II), dando origem a trissomias e monossomias.

Em meiose I, o mecanismo de não-disjunção levará a um gameta dissómico para determinado cromossoma e a um gameta nulissómico para o mesmo cromossoma, por falência na separação dos homólogos. Outra situação que poderá acontecer é a de a primeira divisão meiótica se dar normalmente, mas ocorrer uma não-disjunção em meiose II. Neste caso o que falha é a separação das cromátides.



n – número de cromossomas

Figura 8- Esquema exemplificativo dos mecanismos de não-disjunção em Meiose I e II: não-disjunção de homólogos em Meiose I e não-disjunção de cromátides-irmãos em Meiose II [7]

Estudos centrados nos cromossomas 8, 13, 15, 16, 18 e 21 (Nicolaidis and Petersen, 1998) permitiram inferir que, pelo menos na oogénese, a maioria dos casos de não-disjunção ocorre em meiose I. Outros estudos mostraram ainda que os casos de trissomia 16 são devidos a mecanismos de não-disjunção em meiose I materna e que 90% dos casos de 47,XXX são também erros de origem materna, sendo que metade provém de não-disjunção na primeira divisão meiótica e cerca de 1/3 provém de erros na segunda divisão meiótica, sendo o restante atribuído a acontecimentos pós-zigóticos (Thomas *et al.*, 2001).

A meiose II será o local de erro preferencial para a maioria das trissomias do cromossoma 18.

A maioria das aneuploidias devidas a não-disjunção ocorre durante a oogénese, em regra tanto mais frequentemente quanto maior a idade materna. A vulnerabilidade da meiose materna dever-se-á, principalmente, à degradação progressiva de factores que promovem a adesão dos homólogos, contribuindo para uma maior instabilidade durante a divisão.

O cromossoma X será o único em que a não-disjunção paterna terá uma importância reconhecida (Tabela 2). A não-disjunção (em meiose I) dos cromossomas sexuais no homem originará gâmetas aneuplóides (24,XY) e explica 50% dos casos de indivíduos com cariótipo 47,XXY [GROUP (TECW) , 2008].

Tabela 2² – Mecanismos de não-disjunção dos cromossomas X, 13, 16, 18 e 21

Cromossoma	Materna		Paterna	
	Meiose I	Meiose II	Meiose I	Meiose II
X	++	+	++	-
13	++	+	-	-
16	++	-	N.O.	N.O.
18	+	++	N.O.	N.O.
21	++	+	-	-

(++) - Muito Observado; (+) - Observado; (-) - Pouco Observado; (N.O.) - Não Observado

2.2 ANOMALIAS ESTRUTURAIS

As anomalias estruturais representam alterações que envolvem perdas, ganhos ou mudança de posição de determinados segmentos cromossômicos, sem alteração do número total de cromossomas, e dividem-se habitualmente em translocações, inserções, inversões, deleções, duplicações, isocromossomas e outros rearranjos complexos.

Translocação

É o rearranjo mais comum e envolve a troca de material entre dois cromossomas (Figura 9). As translocações podem ser: *recíprocas* - troca de material envolvendo dois cromossomas - ou *Robertsonianas* - envolve os cromossomas acrocêntricos (13, 14, 15, 21 ou 22), resultando num cromossoma constituído por ambos os braços longos dos cromossomas envolvidos, perdendo-se os braços curtos.

² Adaptado de: GROUP (TECW): *Genetic aspects of female reproduction*, Human Reproduction Update, 2008

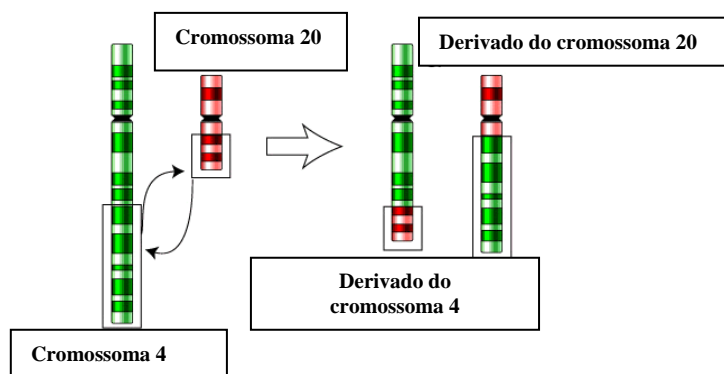


Figura 9- Esquema exemplificativo de translocação recíproca entre os cromossomas 4 e 20 [8]

Inversão

Este rearranjo envolve apenas um cromossoma e caracteriza-se pela inversão de um segmento cromossômico (Figura 10). As inversões podem ser: *paracêntricas* – o segmento invertido não abrange a região do centrômero, ocorrendo num dos braços do cromossoma – ou *pericêntricas* – o segmento invertido abrange a região do centrômero, com um ponto de quebra em cada braço do cromossoma.

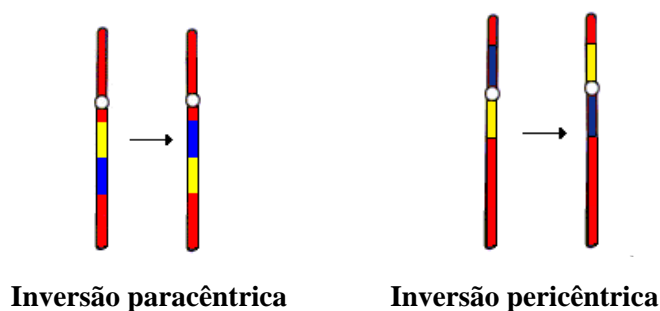


Figura 10 – Esquema exemplificativo de uma inversão paracêntrica e de uma pericêntrica [9]

Inserção

Rearranjo que envolve pelo menos três quebras num ou dois cromossomas e se traduz pela inserção de um segmento cromossômico noutra local do próprio cromossoma – *inserção intracromossômica* – ou noutra cromossoma – *inserção intercromossômica* (Figura 11).

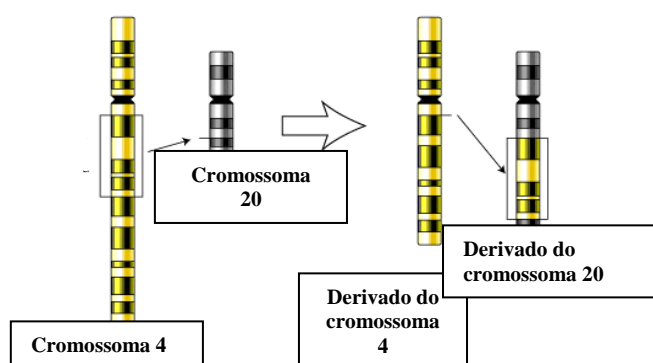


Figura 11 – Esquema exemplificativo de uma inserção intercromossômica (do cromossoma 4 no cromossoma 20) [8]

Deleção

Rearranjo que envolve pelo menos uma quebra num cromossoma com perda subsequente de um segmento intersticial ou terminal - perda de material genético (Figura 12).

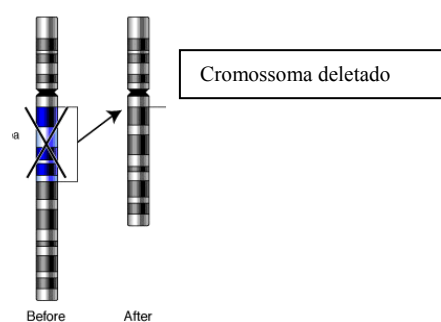


Figura 12 – Esquema exemplificativo de uma deleção intersticial [8]

Duplicação

A duplicação ocorre quando parte de um cromossoma aparece repetida. Este rearranjo resulta num ganho de material genético (Figura 13) .

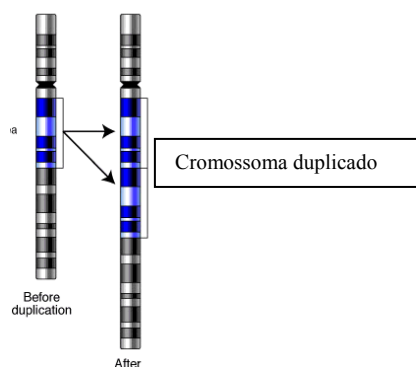


Figura 13 – Esquema exemplificativo de uma duplicação [8]

Isocromossoma

Este rearranjo traduz-se na perda de um braço cromossômico completo e duplicação do outro braço, passando o cromossoma a ser composto por duas cópias “em espelho” do mesmo braço (Figura 14).

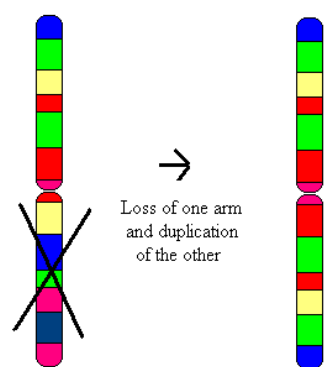


Figura 14 – Esquema exemplificativo de um isocromossoma [10]

Os rearranjos estruturais podem dividir-se em *desequilibrados* ou *equilibrados*, dependendo da ocorrência, ou não, de perdas ou ganhos de material genético. A um nível citogenético, no entanto, apenas se poderá afirmar que o rearranjo é *aparentemente equilibrado*, já que, mesmo com elevada resolução, esta técnica não permite excluir um desequilíbrio genético ao nível de apenas algumas Kilobases de ADN.

Os desequilíbrios cromossômicos dos autossomas levam frequentemente a alterações fenotípicas. O desequilíbrio pode envolver cromossomas inteiros, no caso das aneuploidias, ou partes de cromossomas, nos casos de rearranjos estruturais. As situações de desequilíbrio levam a anomalias de maior ou menor gravidade no desenvolvimento fetal, dependendo do tipo e quantidade de material envolvido. Em casos extremos verificar-se-á inviabilidade embrionária/fetal e, em consequência, aborto

espontâneo. Os casos que envolvem pequenos desequilíbrios genômicos poderão ser compatíveis com a vida intra e extrauterina, embora com o risco de desenvolvimento de uma criança com malformações e/ou atraso mental. Apesar da elevada prevalência de anomalias cromossômicas verificada em gâmetas femininos e, em menor grau, em gâmetas masculinos, 99% dos nados-vivos têm cariótipo normal ou equilibrado, o que resulta de uma elevada mortalidade *in utero* dos desequilíbrios cromossômicos.

Os indivíduos com maior probabilidade de produzir gâmetas anormais serão, naturalmente, os portadores de rearranjos cromossômicos equilibrados (por exemplo, translocação), dada a maior probabilidade de ocorrerem erros de segregação durante a gametogénese.

Durante a meiose, os cromossomas com uma translocação equilibrada dispõem-se numa configuração quadrivalente (em forma de cruz) e podem sofrer vários modos de segregação, dando origem a diferentes tipos de gâmetas: **segregação 2:2** equilibrada (alternada) ou desequilibrada (adjacente 1 e 2), **segregação 3:1** e **segregação 4:0**. A expressão **n:n** designa o número de cromossomas que migra para cada célula. Assim, a segregação 2:2 será a única capaz de formar gâmetas normais (Figura 15).

Segregação 2:2 alternada

Um dos gâmetas recebe o par de cromossomas normal e o outro recebe o par de cromossomas com o rearranjo equilibrado. Este será, portanto, o único modo de segregação que leva a um cariótipo normal ou a um cariótipo com um rearranjo equilibrado, contendo a totalidade do complemento genético.

Representando os cromossomas por A, B, A' e B' (A e B normais e A' e B' equilibrados), neste modo de segregação os gâmetas serão compostos por **A&B** ou **A'&B'**, respectivamente.

Segregação 2:2 adjacente

Este modo de segregação divide-se em *adjacente 1* e *adjacente 2*.

Na segregação *adjacente 1*, os cromossomas adjacentes não homólogos migram para a mesma célula, ficando cada uma com um cromossoma normal e um outro com o rearranjo, numa situação de desequilíbrio. Esta segregação dará origem a gâmetas **A&B'** e **B&A'**.

Na segregação *adjacente 2*, os cromossomas homólogos migram para a mesma célula – filha, num processo que poderá lembrar a não-disjunção. Aqui, os gâmetas formados

serão **A&A'** e **B&B'**.

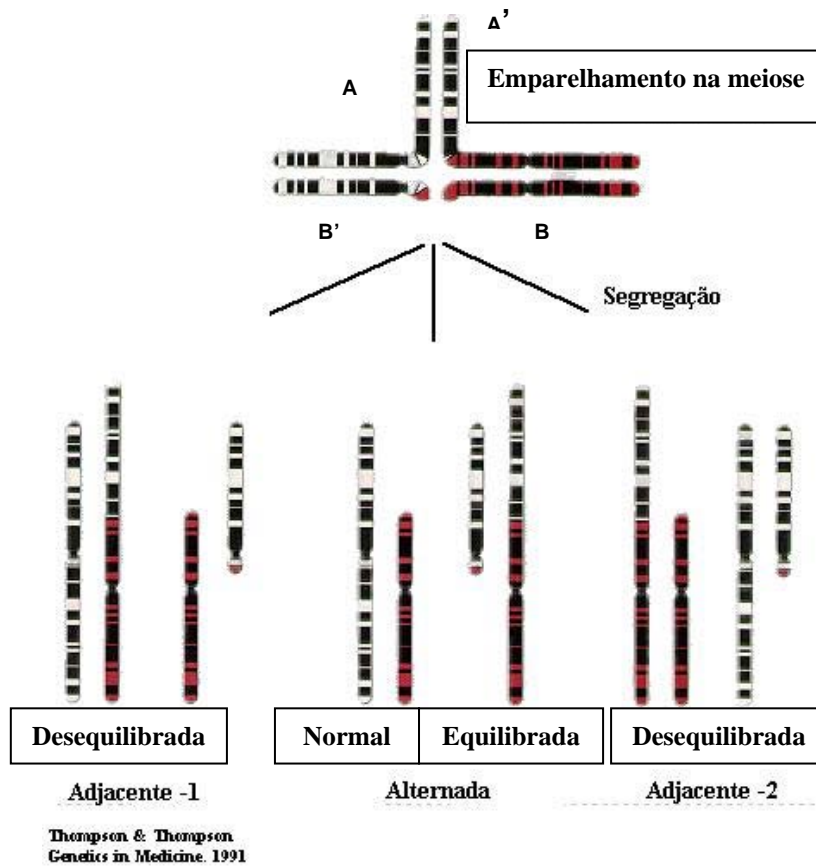


Figura 15 – Modos de segregação [11]

Segregação 3:1

Este tipo de segregação está na origem de aneuploidias. Assim, três dos cromossomas migrarão para um gameta (que passará a ter, portanto, 24 cromossomas), ficando o gameta complementar com apenas um dos cromossomas (e um total de 22 cromossomas), originando um zigoto com 47 ou 45 cromossomas, respectivamente. Normalmente, só o zigoto contendo 47 cromossomas é viável.

Há oito possibilidades de gametas:

AB&A' e **B'**

AB&B' e **A'**

A'B'&A e **B**

A'B'&B e **A**,

sendo os dois primeiros grupos os mais comuns.

Segregação 4:0

Este tipo de segregação dá origem a duplas trissomias ou monossomias e só uma pequena parte dos gametas formados será viável (**AB&A'B'** e **0**).

(Gardner, 2004)

3. CITOGENÉTICA DE ABORTOS ESPONTÂNEOS

As aneuploidias podem representar desequilíbrios tão graves que resultarão em morte celular, mesmo antes da formação do blastocisto (Miller *et al.*, 1980). As monossomias são a maior causa deste tipo de situações, por serem incompatíveis com a sobrevivência do embrião/feto, excepto a monossomia do cromossoma X [Síndrome de Turner (45,X)].

É no primeiro trimestre de gravidez que ocorre a maioria dos abortos espontâneos (em gravidezes clinicamente reconhecidas), dos quais um pouco mais de 50% são devidos a anomalias cromossômicas (Hassold *et al.*, 1980). Destas, as trissomias representam cerca de 30% das causas de aborto, a monossomia X representa cerca de 9% e as triploidias cerca de 10%, sendo o resto (aproximadamente 2%) atribuído a rearranjos cromossômicos estruturais (Tabela 3).

Tabela 3³ – Frequência de anomalias cromossômicas em abortos espontâneos

	ANOMALIAS CROMOSSÔMICAS (%)					
	45,X	Trissomia	Poliploidia	Estruturais	Outras	Total
Aborto espontâneo	8.60	26.8	9.8	2.0	0.7	47.9
Nado morto	0.25	3.8	0.6	0.4	0.6	5.65
Nascimento	<0.01	0.3	-	0.6	0.02	0.93
Gravidezes reconhecidas clinicamente*	1.30	4.3	1.5	0.8	0.15	8.05

* - assumindo 15% e abortos espontâneos e 1% de nados mortos (Jacobs and Hassold, 1995)

As trissomias, como anomalia mais comum nos abortos espontâneos, têm a sua frequência associada à idade materna avançada, sendo muito baixa aos 20-24 anos e aumentando para 35% aos 40-44 anos (Warburton, 2007) (Tabela 4).

³ Adaptado de: GROUP (TECW): *Genetic aspects of female reproduction*, Human Reproduction Update, 2008

Tabela 4⁴ – Abortos espontâneos – efeito do aumento da idade materna na incidência de anomalias cromossômicas

IM média (anos)	Cariótipo Normal (%)	45,X (%)	Trissomias (%)	Duplas trissomias (%)	Poliploidias (%)	Estruturais (%)	Outras (%)
28,6	60	6,5	22	0,72	8,3	1,6	0,6
34,2	32	7	42	3	12	3	1

IM – Idade Materna

Teoricamente, a cada trissomia reconhecida deveria corresponder uma monossomia, mas a única monossomia clinicamente detectada é a dos cromossomas sexuais.

A Tabela 5 mostra a frequência de trissomias nos diferentes cromossomas, sendo a 16 a mais comum, embora o feto nunca sobreviva até ao nascimento. Em segundo lugar aparecem as trissomias dos cromossomas 21 e 22.

Apenas três trissomias autossômicas são, em princípio, compatíveis com a vida, as trissomias dos cromossomas 13, 18 e 21.

⁴ Adaptado de Warburton, 2007

Tabela 5 ⁵ – Frequência (%) e probabilidade de sobrevivência (%) de trissomias e monossomia X

Cromossoma	Abortos espontâneos	Nados mortos	Nascimentos	Probabilidade de sobrevivência
1-12	0.1-1.1	0	0	0
13	1.1	0.3	0.005	2.8
14	1	-	-	0
15	1.7	-	-	0
16	7.5	-	-	0
17	0.1	-	-	0
18	1.1	1.2	0.01	5.4
19	-	-	-	-
20	0.6	-	-	0
21	2.3	1.1	0.12	22.1
22	2.7	0.1	-	0
trissomia em mosaico	1.1	0.5	0.02	9
dupla trissomia	0.8	-	-	0
XXY	0.2	0.4	0.05	55.3
XXX	0.1	0.3	0.05	70
XYY	-	-	0.05	100
X0	8.6	0.25	<0.01	0.3
Total	34.7	4.25	0.3	4.6

- assumindo 15% de abortos espontâneos e 1% de nados mortos

A morte fetal poderá ocorrer num período mais avançado da gravidez, nomeadamente no segundo trimestre. Nestes casos, as anomalias cromossômicas mais frequentemente encontradas são aquelas consideradas “viáveis”.

O risco de recorrência de trissomias livres é inferior a 1%, em mulheres com idades inferiores a 35 anos (Regateiro FJ, 2003).

⁵ Adaptado de: GROUP (TECW): *Genetic aspects of female reproduction*, Human Reproduction Update, 2008

4. ABORTO RECORRENTE

Aborto recorrente define-se como três ou mais abortos consecutivos, embora alguns autores considerem o limite de dois abortos, e afecta cerca de 1% dos casais que tentam ter filhos (Ray and Regan, 2006). Para um casal com história de dois abortos, o risco de um aborto na gravidez seguinte é de cerca de 25%, aumentando para cerca de 33% num casal com história de três abortos espontâneos.

As causas dos abortos recorrentes permanecem por explicar em cerca de 80% dos casos, sugerindo a possibilidade de causas genéticas. No entanto, estes acontecimentos podem ser associados a motivos variados para além dos genéticos, como factores endócrinos, infecciosos, anatómicos ou imunológicos.

O risco de recorrência de um aborto é maior se se confirmar um cariótipo normal num produto de concepção do que se se verificar alguma anomalia cromossómica, sendo de sublinhar que os abortos recorrentes apresentam normalmente cariótipos normais (Lauritsen, 1976).

Apesar das avaliações negativas, aproximadamente 70% dos casais terá uma gravidez subsequente bem sucedida, pelo que se julga que muitos dos abortos recorrentes acontecerão por acaso.

Também nestes casos a idade materna é um factor de importância relevante. Para as mulheres com três ou mais abortos espontâneos, o risco de um próximo aumenta de 40% aos 35 – 39 anos para 60% aos 40 – 44 anos (Nybo Andersen *et al.*, 2000).

Sabendo que em aproximadamente 3% - 4% dos casais com abortos recorrentes um dos membros tem um rearranjo estrutural equilibrado (De Braekeleer and Dao, 1990; Clifford *et al.*, 1994; Franssen *et al.*, 2006; Stephenson and Sierra, 2006; Ray and Regan, 2006) - uma translocação recíproca equilibrada ou uma translocação Robertsoniana - a análise citogenética destes casais e dos produtos de abortamento é um instrumento de grande utilidade na procura das causas destas ocorrências. Os portadores de translocações equilibradas são, habitualmente, fenotipicamente normais, podendo, no entanto, produzir gâmetas anormais devido à já referida segregação desequilibrada dos cromossomas na meiose. O risco reprodutivo depende do tipo de rearranjo encontrado e do elemento do casal que é portador desse rearranjo (Munne *et al.*, 2000). No entanto,

diferentes estudos mostram que as probabilidades de gravidezes levadas a termo com nascimento de crianças normais são consideravelmente elevadas: Carp *et al.*. (2004) mostram um sucesso de 45%; Stephenson and Sierra (2006) apresentam 71% de nascimentos normais e Franssen *et al.*. (2006) apresenta, no seu estudo, 83% de gravidezes bem sucedidas. No entanto, dado que estes casais têm um risco acrescido de formação de gâmetas desequilibrados, deverá ser disponibilizado o diagnóstico pré-natal.

As aberrações cromossómicas representam, portanto, uma causa frequente de anomalias e morte fetal, pelo que a análise citogenética se apresenta como uma ferramenta de enorme importância na pesquisa das causas de insucesso reprodutivo. Do mesmo modo, a análise de produtos de abortamento é uma das rotinas mais informativa na avaliação das causas do aborto. A análise citogenética convencional, o cariótipo, continua a ser considerada a técnica de referência nestes estudos, embora não consiga frequentemente detectar rearranjos de segmentos genómicos menores do que 5-10 Mb, revelar a origem de marcadores supranumerários ou detectar rearranjos subteloméricos subtis.

No entanto, esta técnica envolve a cultura de células que, no caso dos produtos de abortamento, está frequentemente [10% a 40% (Lomax *et al.*, 2000; Fritz *et al.*, 2001)] associada ao insucesso, além de que pode existir um crescimento preferencial de células de origem materna, se existir contaminação materna na amostra, o que pode não ser detectado em casos de fetos do sexo feminino.

Nestes casos, é possível recorrer a técnicas de biologia molecular: **QF-PCR** (*Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction*) e **MLPA** (*Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification*), que permitem a detecção rápida de anomalias cromossómicas numéricas, sem necessitarem de cultura celular.

5. PCR (*Polymerase Chain Reaction*)

A PCR (*Polymerase Chain Reaction*) é uma técnica de biologia molecular desenvolvida em 1983, por Kary Mullis (Prémio Nobel), que hoje se revela indispensável na prática corrente de laboratórios médicos, de investigação biológica e de outras ciências.

Os conceitos básicos desta técnica assentam na amplificação de ADN por replicação enzimática (ADN polimerase). A PCR permite, assim, numa sequência de reacções, a amplificação exponencial de um fragmento de ADN-alvo.

Para que se dê uma reacção de PCR são necessários alguns componentes, sendo os principais a enzima ADN polimerase, os *primers* (específicos para a sequência-alvo), desoxinucleotídeos, tampão de reacção e $MgCl_2$ (co-factor da ADN polimerase).

A *Taq polymerase* é uma enzima isolada da bactéria *Thermus aquaticus*, capaz de tolerar altas temperaturas, como as requeridas numa reacção de PCR.

Os *primers* são normalmente sequências de cerca de 20 nucleotídeos, complementares com as sequências adjacentes do ADN-alvo.

A PCR tem a duração de algumas horas (2-4 horas) e consiste em 20 a 50 ciclos de oscilações de temperatura. O ciclo inicia-se com a **desnaturação** do ADN a cerca de 95°C, temperatura à qual se quebram as pontes de hidrogénio formadas entre as duas cadeias de ADN. Em seguida, procede-se à diminuição da temperatura para cerca de 60°C para que ocorra o **emparelhamento** dos *primers* (*annealing*) às sequências complementares, segundo as regras da complementaridade de bases (A-T; C-G) e através de pontes de hidrogénio. Posteriormente, a temperatura é aumentada para 72°C, ocorrendo a **extensão** dos *primers*, que consiste na adição de nucleotídeos à extremidade 3' do respectivo *primer*. No final deste ciclo existirão duas cópias de cadeia dupla do ADN-alvo. Este ciclo é repetido 20-50 vezes, aumentando exponencialmente o número de cópias (Figura 16).

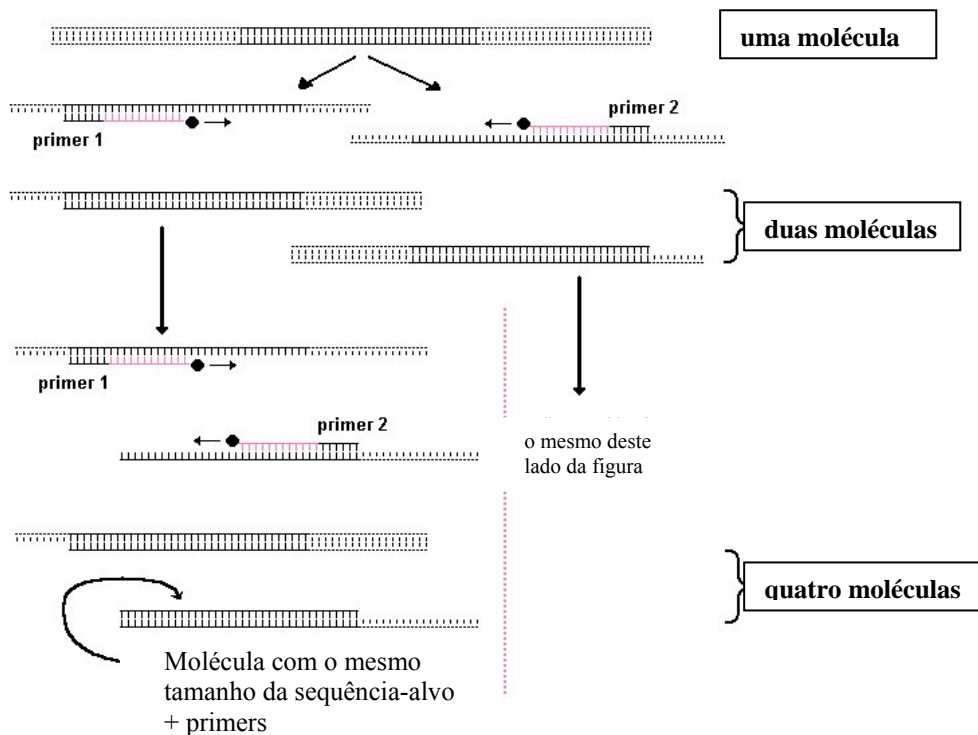


Figura 16 – Esquema representativo de dois ciclos de reacção de PCR [12]

Numa experiência de PCR todos os componentes são adicionados no início da reacção, não necessitando posteriormente de qualquer tipo de acção por parte de quem a realiza.

Para que a reacção de polimerização não seja limitante, a quantidade de *primers* e oligonucleotídeos livres é cerca de 10^7 vezes superior à quantidade de ADN-alvo.

No final dos ciclos são obtidos milhões de cópias da sequência-alvo, designados por **amplicões**. O número de amplicões obtidos pode ser calculado por :

$$M_f = M_i \times 2^n$$

em que M_f é o número de amplicões produzido, M_i é o número inicial de moléculas e n é o número de ciclos.

A reacção de PCR pode ser afectada por diversos factores, sendo os mais importantes a temperatura de *annealing* e a concentração de $MgCl_2$.

Deste modo, sabendo que a temperatura é determinante no *annealing* dos *primers* à sequência-alvo, temperaturas mais baixas poderão induzir emparelhamentos inespecíficos (noutros locais da molécula de ADN-alvo).

A concentração de Mg^{2+} , por sua vez, também afecta a especificidade de

emparelhamento e a extensão dos *primers*, aconselhando-se a utilização de Mg^{2+} numa gama de concentrações entre 1,5 e 3,0 mM. Concentrações acima deste intervalo resultam, geralmente, em emparelhamentos inespecíficos e abaixo do mesmo poderá não existir amplificação de qualquer produto.

A concentração dos *primers* deve situar-se entre 0,1 e 1,0 μM e a de trifosfatos de nucleotídeos (dNTP) é estabelecida nos 200 μM . Estas concentrações devem exceder em grande escala a concentração da sequência-alvo, para que não seja diminuída a taxa de reacção durante o processo de amplificação.

Por último, a concentração de enzima é habitualmente cerca de 1 nM, não sendo a taxa de reacção afectada pela concentração de *Taq*.

O resultado final de uma experiência de PCR é a produção de milhões de amplicões. A forma mais comum de detectar os produtos de PCR é por **electroforese** em gel de agarose ou poliacrilamida (Figura 17), em que cada fragmento aparece como uma banda cujas dimensões podem ser estimadas por comparação a padrões de peso molecular conhecido.

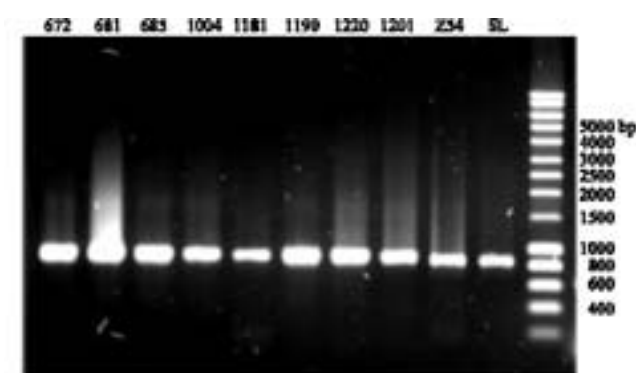


Figura 17 – Resultado de uma electroforese [13]

5.1 QF-PCR (*Quantitative Fluorescent PCR*)

O ADN de muitas espécies contém pequenas sequências que se repetem de algumas até milhares vezes, formando sequências de comprimentos variados - **STR's**: *Short Tandem Repeats* [regiões do genoma hipervariáveis, formadas por elementos de repetição de 2 a 7 bp, cujo carácter polimórfico advém da variação do número de unidades repetidas (GROUP, UMD, 1995)]:

- **Microssatélites** – unidades de ADN formadas por repetições de 2 a 4 pares de bases (bp);
- **Minissatélites** – unidades de ADN formadas por repetições em número superior de pares de bases (até 100 bp).

Os STR's são facilmente detectáveis por PCR e, dado que o seu tamanho pode variar entre cromossomas homólogos (heterozigotia), são normalmente utilizados como marcadores na construção de mapas genéticos (Adinolfi *et al.*, 1997).

Desde 1993 que os STR's são utilizados para detectar anomalias cromossómicas específicas, devido ao seu polimorfismo, estabilidade no tempo de vida de um indivíduo e adequação a ensaios *multiplex*. Os mais utilizados contêm repetições de tetranucleotídeos, por terem uma maior estabilidade durante o processo de amplificação.

Em 1993, Mansfield desenvolveu uma estratégia de marcação fluorescente de *primers* para detectar trissomias dos cromossomas 21 e 18. A marcação dos produtos de PCR é assegurada através da utilização de *primers* marcados, para cada STR. Dado que na fase exponencial da amplificação a quantidade de produto produzido é proporcional à quantidade da sequência-alvo inicial (Ferrer, 1992), esta técnica pode ser usada para a detecção de aneuploidias.

Assim, o QF-PCR baseia-se na amplificação de sequências específicas de ADN (STR's), polimórficas em comprimento entre indivíduos. Esta técnica utiliza *primers* fluorescentes, num ensaio *multiplex*, que permitirão a visualização e quantificação (através da análise automatizada da intensidade de fluorescência detectada por um sequenciador automático) dos segmentos amplificados. O número óptimo de ciclos de PCR deverá ser avaliado de modo a obter, em heterozigotia, dois picos de igual actividade de fluorescência correspondentes a dois alelos diferentes num *locus* (Adinolfi *et al.*, 1997). Para cada cromossoma analisado, a interpretação dos resultados baseia-se no número de picos de fluorescência, bem como no cálculo das rácios entre esses picos, utilizando a altura dos picos, a sua área ou ambos.

Normalmente são utilizados 3 a 4 STR's por cromossoma, de modo a reduzir o número de resultados não informativos.

Deste modo, indivíduos normais heterozigóticos deverão apresentar rácios de 1:1. Se o STR for altamente polimórfico, poucos serão os indivíduos homozigóticos, que mostrarão apenas um pico (Figura 18).

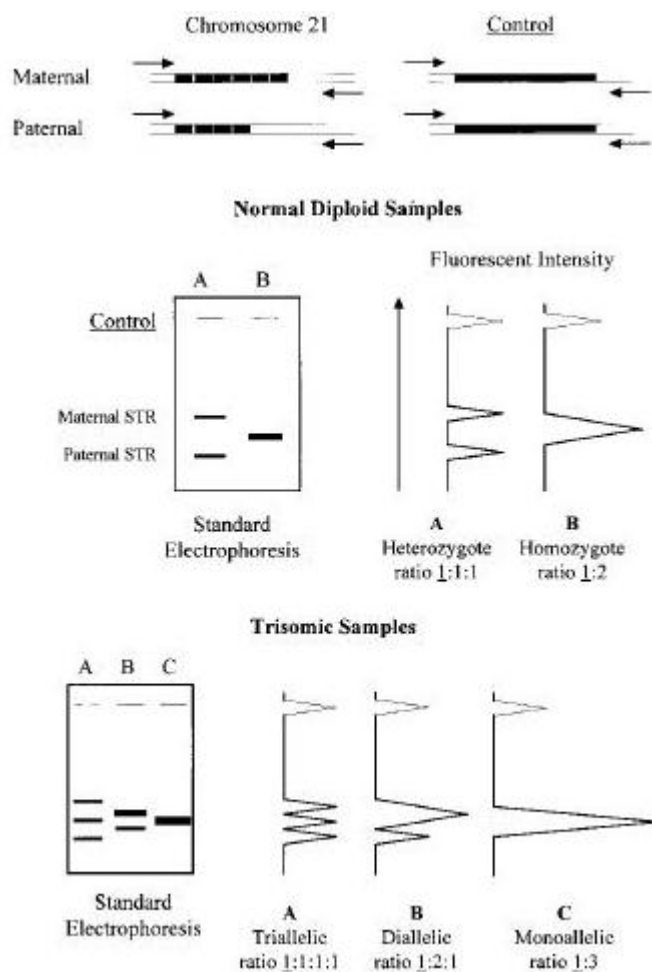


Figura 18 – Representação esquemática da detecção de trissomias utilizando STR's específicos e a técnica de QF-PCR (Adinolfi *et al.*, 1997)

Num indivíduo trissômico, três doses de marcador serão detectadas, numa das possíveis formas:

- **3 picos** de fluorescência com uma razão de **1:1:1** (trissômico trialélico) (Figura 18 – A)

Ou

- **2 picos** de fluorescência com uma razão de **2:1** (trissômico dialélico) (Figura 18 – B)

Devido ao alto grau de polimorfismo dos STR's, muito poucos indivíduos trissômicos apresentarão um só pico de actividade (trissômicos monoalélicos). (Figura 18 – C)

Como já foi referido, as anomalias cromossómicas mais comuns, cuja frequência aumenta com o aumento da idade materna, estão relacionadas com erros de não-disjunção que resultam em aneuploidias. A falência do cariótipo como teste (em oposição ao “erro” do teste, que pode dever-se a contaminação ou erro laboratorial) deve-se ao insucesso da cultura celular. Deste modo, o QF-PCR poderá desempenhar um importante papel na detecção de algumas destas anomalias, porventura apresentando uma alternativa válida ao cariótipo (Nicolini *et al.*, 2004).

Vantagens do QF-PCR:

- 1 - requer pouca quantidade de ADN e não necessita de cultura celular;
- 2 - tem uma sensibilidade na detecção de aneuploidias de 99,2% (Nicolini, 1992);
- 3 - permite resultados em 24-48h;
- 4 - permite a detecção de contaminação materna, triploidias 69,XXX e a origem (materna ou paterna) de material genético extra.

Desvantagens do QF-PCR:

- 1 - poderá ocorrer o fenómeno de amplificação preferencial de um alelo – *preferential amplification* ou *allele drop-out* -, em que um dos dois alelos presentes numa célula diplóide é amplificado preferencialmente no início da reacção de PCR, resultando na distorção da razão e consequente possível erro na interpretação dos resultados (não informativo) (Finlay, 1995; Ray, 1996; Adinolfi *et al.*, 1997);
- 2 – permite identificar apenas as anomalias que estão a ser procuradas;
- 3 – não detecta rearranjos equilibrados nem quaisquer desequilíbrios cromossómicos envolvendo regiões fora das localizações dos STR's utilizados.

6. MLPA (Multiplex Ligation-dependent Probe Amplification)

A MLPA é uma técnica desenvolvida e comercializada pelo grupo MRC-Holland que permite a amplificação de um número elevado (40-45) sequências de ácido nucleico numa única reacção. Esta técnica permite detectar duplicações/deleções numa grande variedade de regiões do genoma, podendo ser utilizada em ADN ou mARN.

Este método requer apenas 20 ng de ADN e consegue discriminar sequências cujo tamanho difere de apenas um nucleótido (Figura 19).

Para além da pequena quantidade de amostra necessária, a MLPA é uma técnica com muitas outras vantagens, como rapidez (resultado obtido em apenas 24h) e simplicidade do protocolo.

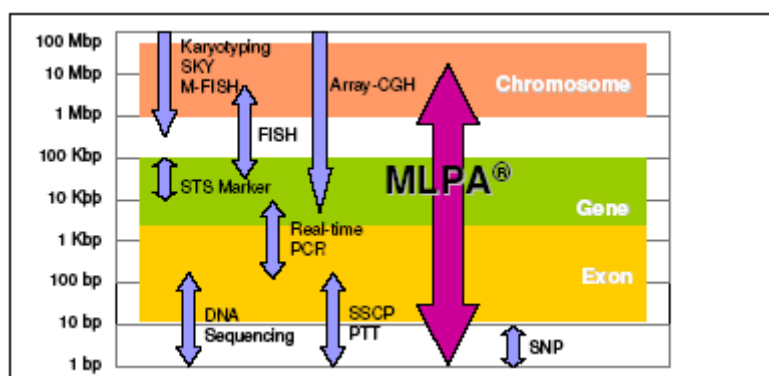


Figura 19 – Comparação da MLPA com outras técnicas [14]

Os ensaios de MLPA são desenhados de forma a que apenas um par de *primers* possa amplificar todos os fragmentos, ao contrário de uma reacção de PCR convencional, em que são utilizados tantos pares de *primers* quantos os fragmentos a amplificar.

Na MLPA, para cada sequência-alvo existem duas sondas. Cada sonda está acoplada a um segmento de ADN de tamanho variável e sequências idênticas em 3' e 5' (*stuffer sequence*), o qual, por sua vez, se liga a um par de *primers* idêntico em todas as sondas. Após hibridação das sondas com a sequência-alvo, procede-se à ligação enzimática das mesmas (utilizando uma ADN ligase). A *stuffer sequence* não hibridiza com a sequência-alvo, o que permitirá que cada fragmento a amplificar apresente diferentes tamanhos. Só quando as duas sondas são hibridizadas à sequência-alvo é que poderão ligar-se e permitir, posteriormente, a amplificação (Figura 20).

Apenas as sondas que foram eficientemente ligadas serão amplificadas e produzirão sinal. As outras, não ligadas e contendo apenas uma sequência *primer*, não serão

amplificadas, pelo que não existirá o sinal fluorescente correspondente. Deste modo, não é necessária a remoção de elementos não ligados.

As *probe-mix* utilizadas nestes testes contêm oito sondas diferentes para cada um dos cromossomas 13, 18 e 21, quatro sondas diferentes para cada um dos cromossomas X e Y e oito sondas específicas para outros cromossomas.

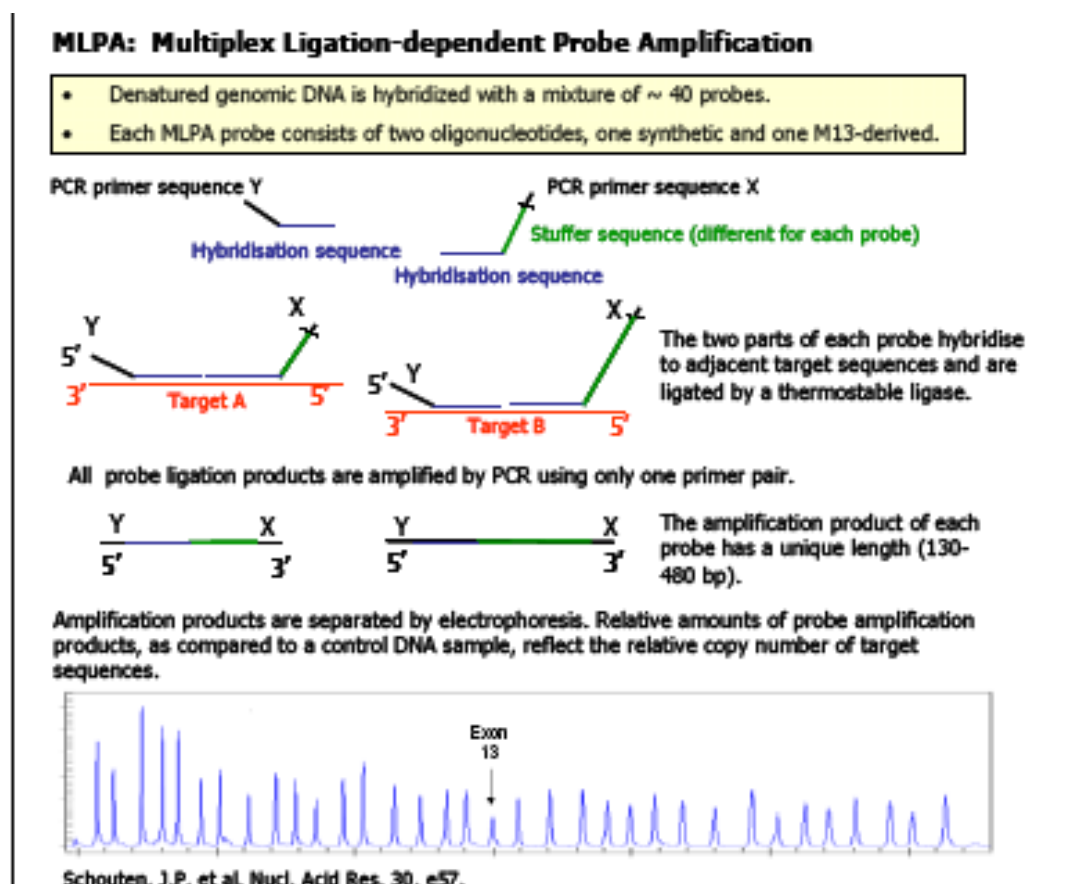


Figura 20 – Esquema exemplificativo de MLPA [14]

Os resultados de uma experiência de MLPA são interpretados por leitura dos picos de fluorescência detectados por electroforese capilar e comparação com um padrão de referência ou com as rácios entre os diferentes cromossomas marcadores. Com esta comparação, diferenças de área dos picos reflectem números distintos de cópias presentes da sequência analisada e a rácio observada entre as áreas de picos diferentes reflectirá a rácio existente entre o número de cópias das sequências em questão. Uma deleção de um ou mais exões, por exemplo, revelará uma diminuição do pico para metade, relativamente aos picos respeitantes aos demais exões (Figura 21).

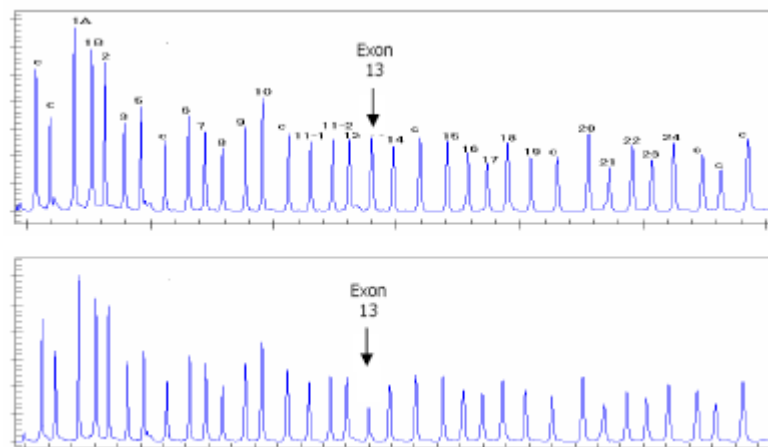


Figura 21— Resultados de uma análise: ADN controlo (em cima) e ADN com deleção do exão 13 (em baixo) [14]

Vantagens da MLPA:

- 1- pode ser usada em diversas aplicações, seguindo o mesmo protocolo, diferindo apenas na *probe-mix* utilizada;
- 2- permite a análise de 45 sequências numa única reacção;
- 3- é barata!
- 4- é reprodutível, fácil de executar e interpretar;
- 5- é sensível, requerendo apenas 20 ng de ADN;
- 6- é rápida, obtendo-se resultados em apenas 24h;
- 7- exige poucos equipamentos, sendo apenas necessários um termociclador e um sequenciador automático (equipamentos normalmente disponíveis num laboratório de biologia molecular).

Desvantagens da MLPA:

- 1- não permite a detecção de triploidias em casos do sexo feminino (69,XXX);
- 2- pode não detectar trissomias parciais ou em mosaico, desde que não sejam utilizadas sondas localizadas nos segmentos envolvidos nessas anomalias;
- 3- não detecta anomalias estruturais equilibradas;
- 4- não detecta contaminação materna;
- 5- exige qualidade superior de ADN do que a requerida pela QF-PCR.

II OBJECTIVO

Avaliar o eventual interesse da utilização de técnicas de Biologia Molecular (MLPA e QF-PCR) na detecção de anomalias cromossómicas de produtos de abortamento como complemento/ alternativa às técnicas de citogenética convencional, em situações de insucesso de cultura celular.

III MATERIAIS E MÉTODOS

1. MATERIAL BIOLÓGICO

As amostras biológicas de produtos de abortamento utilizadas neste estudo foram recebidas pelo laboratório para efeitos de diagnóstico e incluem diferentes tipos de tecidos: placenta, pele fetal, restos ovulares e cordão umbilical.

Embora na maioria das vezes se obtenham resultados por citogenética convencional e/ou por técnicas de biologia molecular em amostras de tecidos colhidos, armazenados ou entregues em condições adversas, aqueles deverão ser acondicionados em meio de cultura apropriado ou soro fisiológico e entregues no laboratório para processamento até 24 horas após a colheita.

Neste estudo, as amostras foram agrupadas de acordo com os dados clínicos seguintes: aborto espontâneo, anomalias fetais, idade materna avançada, rastreio bioquímico positivo para Síndrome de Down, história de abortos de repetição, confirmação de DPN (diagnóstico pré-natal) e outras.

Foram analisadas 981 amostras por citogenética convencional, após cultura celular. Destas, 146 amostras foram analisadas pela técnica de biologia molecular MLPA. Nos casos com resultado normal do sexo feminino por MLPA (N,XX) foi realizado QF-PCR, no sentido de se excluïrem triploidias, não detectadas, nestes casos, por MLPA. Este ensaio não foi possível em 8 dos 146 casos.

2.TÉCNICAS

2.1 Citogenética convencional – Cariótipo

2.1.1 Cultura Celular

A cultura celular foi realizada pelo método de cultura *in situ*, segundo os protocolos de rotina utilizados no laboratório.

2.1.2 Coloração e cariotipagem

A análise citogenética foi realizada utilizando os métodos *standard* de coloração e bandagem GTL (Bandas **G** – **T**ripsina – **L**eishman) de alta resolução.

Por caso foi analisado um mínimo de 14 metafases, em microscopia óptica (microscópio Nikon Eclipse E400).

A aquisição de imagens digitais foi possível através de uma câmara fotográfica acoplada ao microscópio (Cooled CCD – **C**harged **C**ouple **D**evice – **C**amera) e a cariotipagem foi realizada utilizando o sistema Cytovision (Applied Imaging International, Newcastle Upon Tyne).

2.2 Técnicas de Biologia Molecular – MLPA + QF-PCR

2.2.1 Extracção de ADN

Reagentes:

- Invisorb Blood Giga *kit*, cat nr 10311303, Company Invitrik
- Etanol a 96% e a 70%
- Água MQ estéril
- 20x AKE e 1x AKE

Protocolo experimental:

- 1 – Triturar a amostra
- 2 – Guardar durante 20 minutos a 4°C ou durante 10 minutos a -20°C
- 3 - Centrifugar a 2000 rpm durante 10 minutos ou a 2500 rpm durante 7 minutos, a 4°C
- 4 – Remover o sobrenadante e dissolver o sedimento em 10 ml de 1xAKE

5 - Repetir o passo 3

6 - Remover o sobrenadante

NOTA: nesta fase poder-se-á armazenar o sedimento a -20°C. Para continuar com o passo 8, descongelá-lo à temperatura ambiente

7 – Adicionar 3 ml do *Buffer 2* e transferir o sedimento para um tubo de centrifuga de 15 ml

8 – Adicionar 50 µl de *Proteinase K* (20 mg/ml) e misturar cuidadosamente, invertendo o tubo

9 – Incubar durante 1 hora ou, no máximo, *overnight*, em banho-maria a 60°C, em agitação contínua

10 – Adicionar 1,8 ml de *Buffer 3* e agitar no *vortex* durante 10 segundos

11 – Incubar em gelo durante 5 minutos

12 – Centrifugar durante 15 minutos a 4000 rpm

13 – Transferir cuidadosamente o sobrenadante para um tubo de centrifuga de 15 ml

NOTA: se o sobrenadante não estiver completamente transparente, repetir o passo 12

14 – Adicionar etanol a 96% e inverter cuidadosamente o tubo até que o ADN seja precipitado

15 – Transferir o ADN para um tubo de microcentrifuga de 1,5 ml e adicionar 1 ml de etanol a 70%

16 – Lavar o ADN durante 30 minutos, invertendo o tubo várias vezes a cada 5 minutos

17 – Remover o etanol a 70% e adicionar de novo 1 ml de etanol a 70%

18 – Repetir o passo 17

NOTA: o ADN pode ser armazenado em etanol a 70% a 4°C, *overnight*

19 – Remover completamente o etanol e secar o ADN à temperatura ambiente (abrir a tampa do tubo e deixar em repouso)

20 – Dissolver o ADN em 50-200 µl de água MQ

21 – Armazenar a 4°C

2.2.2 QF-PCR

Reagentes:

- dNTPs 2.5 mM cada – Applera Portugal
- MgCl₂ 25 Mm – Applera Portugal
- Gold Buffer 10x – Applera Portugal
- *Primers** Invitrogen
- AmpliTaq 5U/μl – Applera Portugal
- Água MQ B Braun
- TAMRA-500
- Formamida desionizada

*AMXY (Amelogenina) (M1) e AMXY modificado (M3) 10 uM

Foram desenhados três multiplex PCR:

Multiplex1 (M1)	Multiplex2 (M2)	Multiplex3 (M3)
dNTPs-1.5 μl	dNTPs-1.5 μl	dNTPs-1.5 μl
MgCl ₂ -1.7 μl	MgCl ₂ -1.75 μl	MgCl ₂ -1.75 μl
Gold Buffer-2.5 μl	Gold Buffer-2.5 μl	Gold Buffer-2.5 μl
GDPN#XYa*-0.2 μl	GDPN#21b*-0.38 μl	GDPN#XYb*-0.22 μl
GDPN#21a*-0.6 μl	GDPN#13c*-0.38 μl	GDPN#Xb*-0.22 μl
GDPN#18a*-0.3 μl	GDPN#Xa*-0.33 μl	GDPN#Xc*-0.76 μl
GDPN#13a*-0.35 μl	GDPN#18b*-0.65 μl	GDPN#18c*-0.5 μl
GDPN#13b*-4 μl	GDPN#21c*-0.4 μl	GDPN#21e*-0.35 μl
Água MQ-7.25 μl	GDPN#21d*-2.5 μl	Água MQ-7.0 μl
	Água MQ-4.4 μl	

* - Código de identificação dos marcadores atribuído pelo laboratório

Volume total – 14.8 μl

Protocolo experimental:

A amplificação será efectuada num volume final de 25 µl, que contém:

- 14.8 µl de cada *mix* (M1, M2 e M3)
- 3-4 µl ADN
- 0.3 µl AmpliTaq
- água MQ

Programa de PCR:

- 5 minutos a 95°C
- 48 segundos a 94°C,
- 48 segundos a 60°C
- 1 minuto a 72°C
- 30 minutos a 72°
- (para 30 ciclos)

No final, as amostras são mantidas a 4°C

Sequenciação (Electroforese Capilar - ABI)

1 – Preparar, em tubos ABI:

- 1.5-2.0 µl do produto de PCR
- 12 µl de formamida
- 0.5 µl de TAMRA

2 – Colocar os tubos no termociclador e desnaturar a 94°C durante 3 minutos, arrefecendo de seguida a 4°C

3 - correr a amostra no aparelho – **Sequenciador Automático ABI 310**

Condições do aparelho:

- Temperatura – 60°C
- Tempo – 28 minutos
- Tempo injeção – 5 segundos

2.2.3 MLPA

Reagentes:

Nota: Os reagentes utilizados são fornecidos em kits pelo grupo detentor da técnica – MRC-Holland

- água esterilizada
- SALSA *Probe-mix*
- MLPA *buffer*
- Ligase-65 *buffer A*
- Ligase-65 *buffer B*
- água MQ
- Ligase-65
- SALSA FAM PCR – *primers*
- SALSA *Enzyme dilution buffer*
- SALSA *Polymerase*
- TAMRA-500
- formamida desionizada

Protocolo experimental:

Dia 1 – Desnaturação e hibridação das sondas SALSA

- 1- Diluir o ADN (20-500ng ou 5 µl de ADN extraído de líquido amniótico) em 5 µl de água esterilizada (também pode ser utilizado TE - 10mM Tris-HCL pH 8.2; 1 mM EDTA)
- 2 – Preparar um tubo branco com 5 µl de água
- 3 – Colocar os tubos no termociclador no programa de desnaturação:
 - desnaturar durante 5 minutos a 98°C
 - arrefecer a 25°C
- 4 – Adicionar a cada tubo 3 µl da *mix*, que contém:
 - 1,5 µl SALSA *Probe-mix*
 - 1,5 µl MLPA *buffer*
- 5 – Homogeneizar com cuidado

6 – Incubar 1 minuto a 95°C seguida de uma incubação a 60°C durante 16 horas

Dia 2 – Reacção de ligação

1 – Para cada reacção preparar a *Ligase-65 mix* (Vol total = 32 µl) :

→ 3,0 µl *Ligase-65 buffer A*

→ 3,0 µl *Ligase-65 buffer B*

→ 25,0 µl água MQ

(Misturar)

→ 1,0 µl *Ligase-65*

(Misturar e guardar em gelo)

2 – Reduzir a temperatura do termociclador para 54°C

3 – Adicionar, a cada tubo, 32,0 µl *Ligase-65 MIX* e misturar (amostra *MLPA ligation*)

4 – Incubar 15 minutos a 54°C seguido de 5 minutos a 98°C

Reacção de PCR

1 – Preparar, para cada reacção de PCR, a *Polymerase mix*:

→ 1,0 µl SALSA FAM PCR – *primers*

→ 1,0 µl SALSA *Enzyme dilution buffer*

→ 2,75 µl água MQ

(Misturar bem)

→ 0,25 µl SALSA *Polymerase*

(Misturar e guardar em gelo)

2 – Preparar, em novos tubos:

TUBO 1	TUBO 2
→ 2,0 µl 10xSALSA PCR <i>buffer</i>	→ 2,0 µl 10xSALSA PCR <i>buffer</i>
→ 13 µl de água MQ	→ 13 µl de água MQ
→ 5,0 µl de amostra <i>MLPA ligation</i>	→ 5,0 µl do tubo branco

3 – Colocar os tubos no termociclador a 60°C

4 – Adicionar 5,0 µl da *Polymerase mix* a cada tubo e misturar cuidadosamente

5 – Correr o programa de PCR:

- 20 segundos a 95°C
- 30 segundos a 60°C
- 60 segundos a 72°C
- 20 minutos a 72°C
- (para 33 ciclos)

(NOTA: o número de ciclos poderá ser aumentado para 36, se a amostra contiver apenas 10-20 ng de ADN)

Para confirmar a presença de produto, nesta fase as amostras podem ser corridas em gel de agarose (2%) para avaliar a presença/ausência de bandas.

Sequenciação (Electroforese Capilar - ABI)

1 – Preparar, num tubo ABI:

- 0,75 µl do produto de PCR
- 0,75 µl de água MQ
- 0,75 µl de TAMRA-500
- 12,5 µl de formamida desionizada

2 – Colocar os tubos no termociclador e desnaturar a 94°C durante 3 minutos, arrefecendo de seguida a 4°C

3 – Correr a amostra no ABI

Análise de dados de MLPA

1 – Exportar a tabela de resultados, gerada pelo *ABI Genescan software*, para uma folha de Excel;

2 – Normalizar as áreas de cada produto de amplificação dividindo a respectiva área pela soma de todas as áreas dos produtos de amplificação da amostra;

3 – Determinar a média das áreas normalizadas de cada cromossoma marcador;

4 – Calcular a razão entre as médias determinadas.

(as razões relativas deverão ser de 1:1, excepto nos casos XY, comparando autossoma:X ou autossoma:Y, que deverá ser de 2:1)

3. ANÁLISE DE DADOS

- 1 – Descrição e comparação de resultados obtidos por citogenética convencional (cariótipo) e por técnicas de biologia molecular (MLPA e QF-PCR)
- 2 – Comparação dos resultados obtidos com os dados referidos na literatura

4. ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas realizadas consistiram na aplicação do teste do Chi Quadrado no sentido de identificar possíveis diferenças entre os resultados obtidos a partir das duas técnicas utilizadas (Citogenética Convencional e Biologia Molecular). Foi utilizado o programa SPSS, versão 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

IV RESULTADOS

1. Citogenética convencional - Cariótipo

Foram analisados 981 casos por técnicas de citogenética convencional (cariótipo). Em 234 (23,8%) casos não foi possível obter resultados por insucesso da cultura celular. (Gráfico 1)

Dos 747 casos com crescimento celular, nos quais foi realizado o cariótipo, 506 (67,7%) tiveram um resultado normal (46,XX – n=260, ou 46,XY – n=246) e 241 (32,3%) tiveram um resultado anormal:

- 176 aneuploidias dos autossomas (trissomias) – **73,0%**
- 22 aneuploidias dos cromossomas sexuais – **9,1%**
- 28 anomalias estruturais – **11,6%**
- 15 poliploidias – **6,2%**

(Gráfico 2 e Tabela 6)

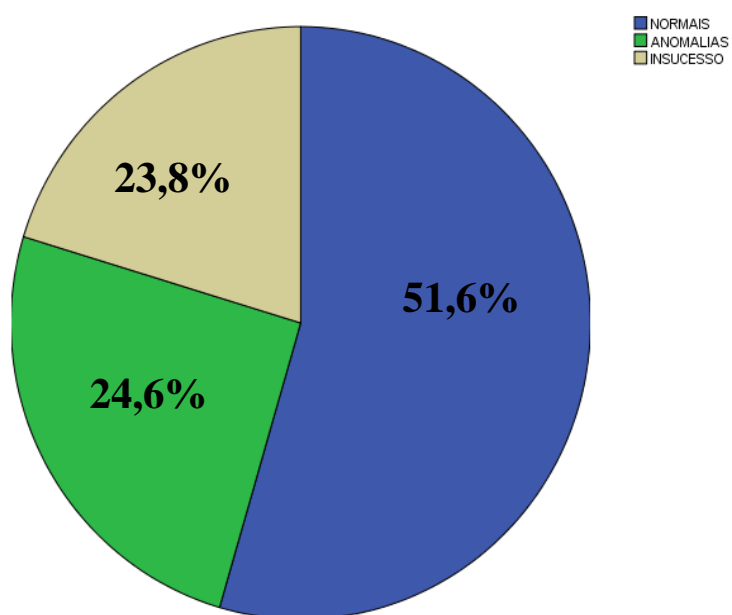
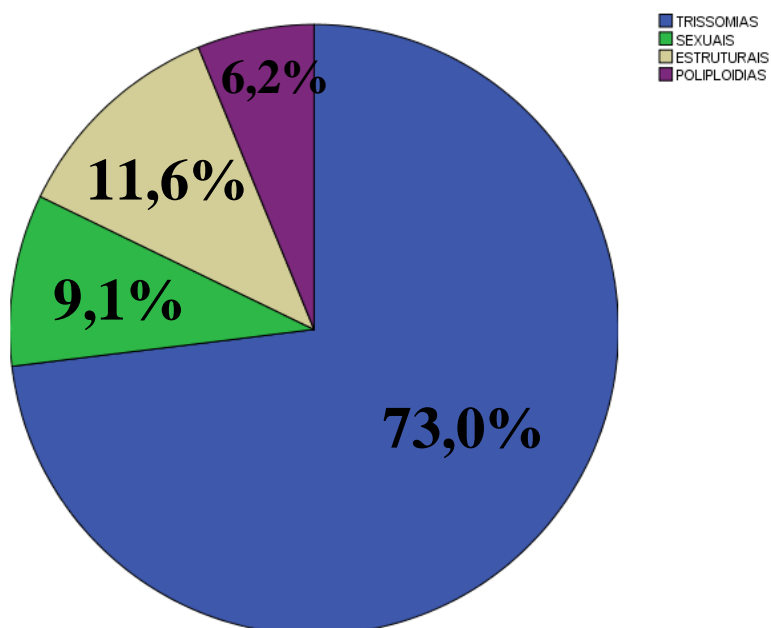
Gráfico 1 – Resultados obtidos por citogenética convencional**Gráfico 2** – Proporção de anomalias cromossômicas encontradas por citogenética convencional

Tabela 6 – Resultados por citogenética convencional (cariótipo)

INDICAÇÃO CLÍNICA	TOTAL	NORMAIS	INSUCESSO CELULAR	ANOMALIAS CROMOSSÓMICAS											
				ANEUPLOIDIAS AUTOSSOMAS							ANEUPLOIDIAS SEXUAIS		ANOMALIAS ESTRUTURAIS		POLIPLOIDIAS
				13	16	18	21	outras	mosaico	dupla	45,X	outras	equilibradas	desequilibradas	
Aborto Espontâneo	234	123	76	0	5	0	1	12	1	0	2	5	0	2	7
Anomalias Fetais	222	133	64	0	0	6	4	2	1	1	1	1	3	5	1
Idade Materna Avançada	210	135	35	5	4	2	6	12	4	1	2	0	1	2	1
Rastreio Bioquímico	26	23	3	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Abortos Anteriores	30	12	9	0	2	0	0	2	0	0	0	0	1	1	3
Confirmação DPN	168	12	34	8	0	18	66	6	0	0	6	3	3	9	3
Não Mencionada	37	28	6	0	0	0	0	0	1	0	2	0	0	0	0
Outros	54	40	7	0	1	0	0	3	0	2	0	0	1	0	0
Total	981	506	234	13	12	26	77	37	7	4	13	9	9	19	15

2. Biologia molecular (MLPA + QF-PCR)

Dos 234 casos sem crescimento celular (por insucesso da cultura *in vitro*), 146 casos foram analisados por técnicas de biologia molecular, MLPA e QF-PCR.

Em 6 (**4,1%**) dos casos não foi possível obter resultados, por má qualidade da amostra, e em 9 (**6,2%**) dos casos apenas se conseguiu confirmar o sexo (inconclusivo).

(Gráfico 3)

Dos 131 casos com resultado conclusivo foram identificados 94 (**71,7%**) resultados normais (para os marcadores utilizados nos testes realizados) e 37 (**28,2%**) anomalias:

- 18 trissomias autossômicas (dos cromossomas 13, 18 ou 21, únicos estudados por estas técnicas) – **48,6%**
- 8 aneuploidias dos cromossomas sexuais (7 das quais correspondentes à Síndrome de Turner – 45,X) – **21,6%**
- 6 poliploidias – **16,2%**
- 2 trissomias parciais – **5,4%**
- 3 com outros tipo de anomalias (2 monossomias e 1 dupla trissomia) – **8,1%**

Em 8 dos casos com resultado normal feminino por MLPA não foi possível a realização do teste de QF-PCR, não se excluindo, assim, triploidias 69,XXX.

(Gráficos 4 e Tabela 7)

Gráfico 3 – Resultados obtidos por MLPA/QF-PCR

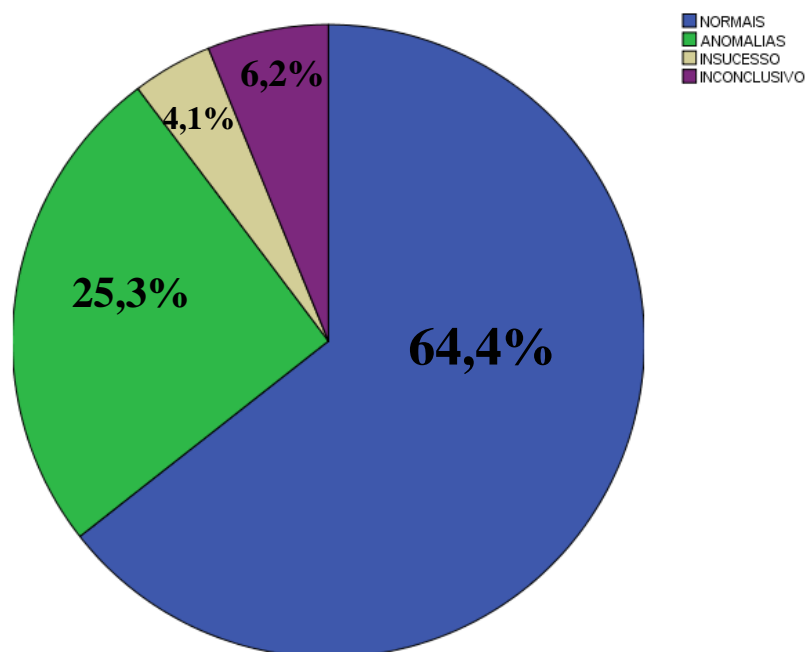


Gráfico 4 – Proporção de anomalias cromossômicas encontradas por MLPA/QF-PCR

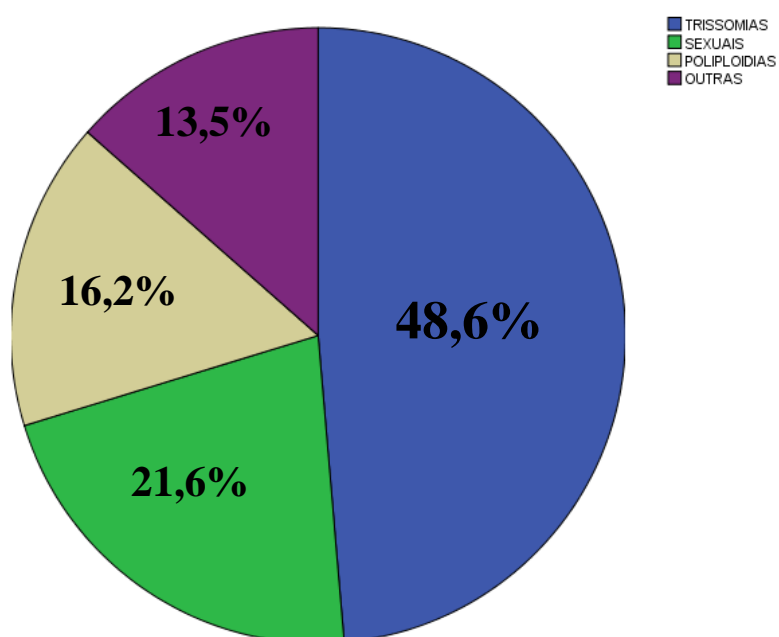


Tabela 7 – Resultados por Biologia Molecular: MLPA e QF-PC

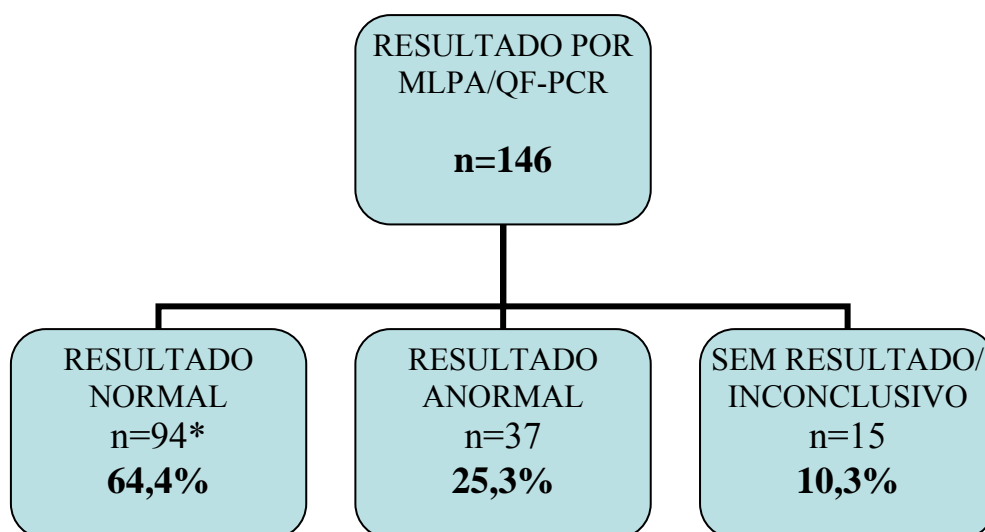
INDICAÇÃO	TOTAL	NORMAL	INCONCLUSIVO	ANOMALIAS CROMOSSÓMICAS							
				TRISSOMIA 13	TRISSOMIA 18	TRISSOMIA 21	TRISSOMIA PARCIAL	45,X	ANEUPLOIDIAS SEXUAIS	POLIPLOIDIAS	OUTRAS
Aborto Espontâneo	67	47*	6	0	1	3	0	4	1	3	2
Anomalia Fetal	4	1	1	0	1	0	0	1	0	0	0
Idade Materna	35	20**	4	1	2	5	2	1	0	0	0
Abortos Anteriores	1	1	0	0	0	0	0	0	0	0	0
Confirmação DPN	5	1	1	0	1	2	0	0	0	0	0
Não Mencionada	28	21***	2	0	2	0	0	0	0	3	1
Outros	5	3	1	0	0	0	0	1	0	0	0
Total	146	94	15	1	7	10	2	7	1	6	3

* - em 2 não se sabe se triplóide (XXX)

** - em 5 não se sabe se triplóide (XXX)

*** - em 1 não se sabe se triplóide (XXX)

Diagrama 1 – Número de casos sem crescimento celular estudados por técnicas de biologia molecular e resultados respectivos.



* - dos quais 8 não se sabe se triplóide (XXX), por não ter sido feito PCR

Tabela 8 – Avaliação estatística da diferença na detecção de anomalias entre técnicas de citogenética convencional e biologia molecular (Teste Chi Quadrado)

Técnica * Normal Crosstabulation					
			Normal		
			0	1	Total
Técnica	Citogenética Convencional	Count	241	506	747
		Expected Count	236,5	510,5	747,0
		% of Total	27,4%	57,6%	85,1%
	Biologia Molecular	Count	37	94	131
		Expected Count	41,5	89,5	131,0
		% of Total	4,2%	10,7%	14,9%
	Total	Count	278	600	878
		Expected Count	278,0	600,0	878,0
		% of Total	31,7%	68,3%	100,0%

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,832 ^a	1	,362		
Continuity Correction ^b	,656	1	,418		
Likelihood Ratio	,846	1	,358		
Fisher's Exact Test				,415	,210
Linear-by-Linear Association	,831	1	,362		
N of Valid Cases	878				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 41,48.

b. Computed only for a 2x2 table

Sabendo o tipo de anomalias detectado por cada uma das técnicas de biologia molecular, foram identificados os casos com cariótipo anormal (**n=241**) (encontrados por citogenética convencional) que aqueles estudos seriam capazes de detectar.

Tabela 9 - Número de casos com cariótipo anormal por citogenética convencional que seriam detectáveis/não detectáveis por MLPA e/ou QF-PCR

	MLPA	QF-PCR
DETECTÁVEIS	57,3%	60,6%
NÃO DETECTÁVEIS	39,4%	36,1%
DE DETECCÇÃO DUVIDOSA*	3,3%	3,3%

* - Resultados de mosaicismos e/ou aneuploidias associadas a rearranjos estruturais desequilibrado

3. INDICAÇÕES CLÍNICAS

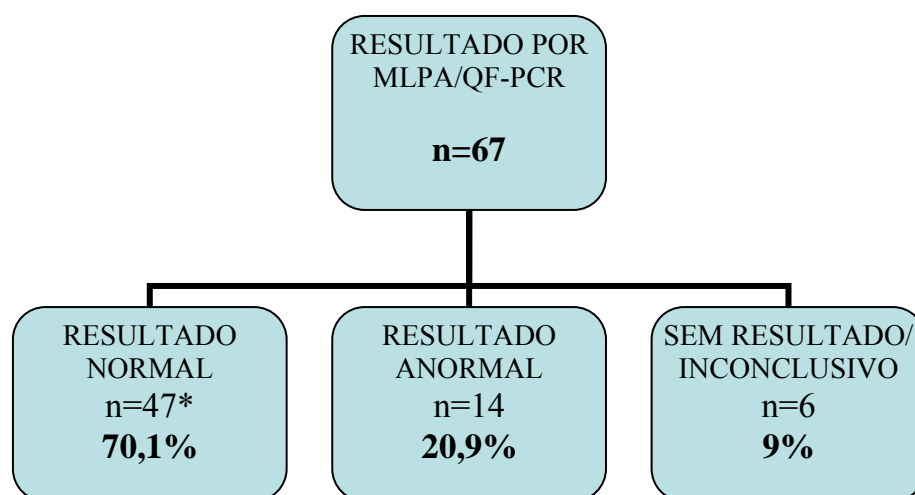
Considerando as principais (mais frequentes) indicações clínicas para realização do exame:

Tabela 10 - Número de casos com cariótipo anormal por citogenética convencional e indicações de Aborto Espontâneo, Anomalias Fetais e Idade Materna Avançada que seriam detectáveis/não detectáveis por MLPA e/ou QF-PCR

	INDICAÇÃO CLÍNICA		
	Aborto Espontâneo	Anomalias Fetais	Idade Materna Avançada
DETECTÁVEIS	28,6%	48%	39%
MLPA	20%	48%	39%
QF-PCR	28,6%	48%	39%
NÃO DETECTÁVEIS	57,1%	48%	58,5%
MLPA	65,7%	48%	58,5%
QF-PCR	57,1%	48%	58,5%
DE DETECÇÃO DUVIDOSA	14,3%	4%	2,5%
MLPA	14,3%	4%	2,5%
QF-PCR	14,3%	4%	2,5%

Resultados dos testes de biologia molecular em casos sem crescimento celular, com indicação de **Aborto Espontâneo** :

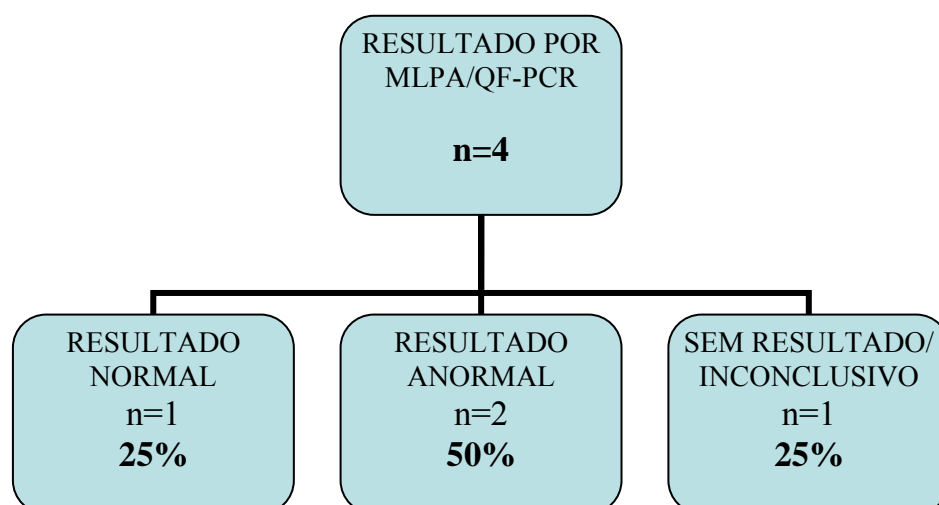
Diagrama 2 – Número de casos sem crescimento celular e com indicação de Aborto Espontâneo que foram estudados por técnicas de biologia molecular e resultados respectivos



* - dos quais 2 não se sabe se triplóide (XXX) por não ter sido feito PCR

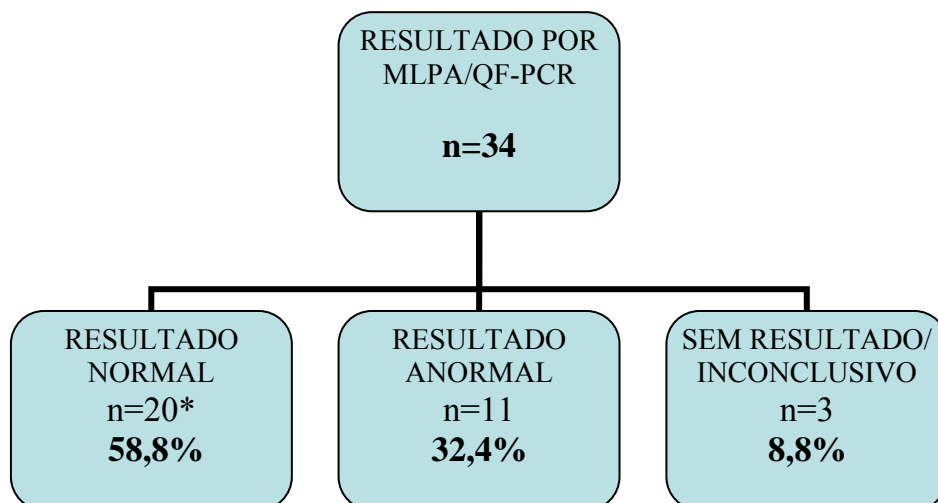
Resultados dos testes de biologia molecular em casos sem crescimento celular, com indicação de **Anomalias Fetais** :

Diagrama 3 – Número de casos sem crescimento celular e com indicação de Anomalias Fetais que foram estudados por técnicas de biologia molecular resultados respectivos.



Resultados dos testes de biologia molecular em casos sem crescimento celular, com indicação de **Idade Materna Avançada** :

Diagrama 4 – Número de casos sem crescimento celular e com indicação de Idade Materna Avançada que foram estudados por técnicas de biologia molecular e resultados respectivos



*- dos quais 5 não se sabe se triplóide (XXX) por não ter sido feito PCR

Excluindo os casos com indicação “Confirmação de DPN”, dos quais a maioria das anomalias encontradas resultou numa interrupção médica (voluntária) da gravidez (não se sabendo se seriam causa de aborto espontâneo) as Tabelas 11 e 12 mostram as percentagens das principais anomalias cromossômicas encontradas nos produtos de abortamento estudados e comparação com os valores apresentados na literatura.

CITOGENÉTICA CONVENCIONAL - CARIÓTIPO

Total de casos – **n = 613**

Total Anomalias – **n = 119 (19,4%)**

MLPA + QF-PCR

Total de casos – **n = 127**

Total Anomalias – **n = 34 (26,8%)**

Tabela 11 – Comparação da frequência de anomalias encontradas com as descritas na literatura

ANOMALIA	CITOGENÉTICA	MLPA+QF-PCR	LITERATURA*
45,X	2,0%	5,5%	8,6%
Trissomias	11,1%	13,4%	26,8%
Poliploidias	2,0%	4,7%	9,8%
Estruturais	2,6%	-	2,0%

Tabela 12 – Comparação das frequências das principais trissomias encontradas em abortos espontâneos com as descritas na literatura

TRISSOMIA	CITOGENÉTICA	MLPA+QF-PCR	LITERATURA*
TRIS 13	0,8%	0,8%	1,1%
TRIS 16	2,0%	-	7,5%
TRIS 18	1,3%	4,7%	1,1%
TRIS 21	1,8%	6,3%	2,3%

*- Dados referidos apenas a citogenética convencional, Tabelas 3 e 5 da INTRODUÇÃO

Tabela 13 – Em abortos espontâneos - Avaliação estatística da diferença na detecção de anomalias cromossômicas entre as técnicas de citogenética convencional e de biologia molecular (Teste Chi Quadrado)

Técnica * Normal Crosstabulation					
			Normal		
			0	1	Total
Técnica	Citogenética Convencional	Count	119	494	613
		Expected Count	126,7	486,3	613,0
		% of Total	16,1%	66,8%	82,8%
	Biologia Molecular	Count	34	93	127
		Expected Count	26,3	100,7	127,0
		% of Total	4,6%	12,6%	17,2%
	Total	Count	153	587	740
		Expected Count	153,0	587,0	740,0
		% of Total	20,7%	79,3%	100,0%

Chi-Square Tests					
	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	3,474 ^a	1	,062	,071	,043
Continuity Correction ^b	3,040	1	,081		
Likelihood Ratio	3,303	1	,069		
Fisher's Exact Test					
Linear-by-Linear Association	3,469	1	,063		
N of Valid Cases	740				

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 26,26.

b. Computed only for a 2x2 table

No sentido de comparar as frequências, em abortos espontâneos, das anomalias detectadas tanto por técnicas de citogenética convencional como por biologia molecular (MLPA+QF-PCR), retiraram-se, dos números anteriores, todos os casos de anomalias não detectáveis com as sondas usadas nas técnicas de MLPA/QF-PCR.

CITOGENÉTICA CONVENCIONAL - CARIÓTIPO

Total de casos – **n = 542**

Total Anomalias – **n = 48 (8,9%)**

MLPA + QF-PCR

Total de casos – **n = 121**

Total Anomalias – **n = 28 (23,1%)**

Tabela 14 - Em abortos espontâneos - Avaliação estatística da diferença na detecção das anomalias cromossômicas identificadas quer por técnicas de citogenética convencional quer por biologia molecular
(Testes de Chi Quadrado – Tabelas em ANEXOS)

RESULTADO	χ^2	<i>p</i>
Total Anomalias	19,887	< 0,001
Trissomia 13	0,010	ns
Trissomia 18	5,804	0,016
Trissomia 21	7,461	0,006
45,X	4,532	0,033
Poliploidia	2,821	ns

ns = não significativo (> 0,05).

V DISCUSSÃO DE RESULTADOS E CONCLUSÃO

1. Citogenética convencional

A taxa de insucesso de cultura celular verificada neste trabalho (**23,9%**) encontra-se dentro do intervalo de 10% - 40% descrito na literatura (Lomax *et al.*, 2000; Fritz *et al.*, 2001).

Nos casos de sucesso de cultura celular, foi realizado o estudo citogenético dos produtos de abortamento, tendo-se obtido resultados, em média, ao fim de 8 dias de cultura.

Nesta análise a frequência de anomalias encontradas em abortos espontâneos (**19,4%**) revelou-se bastante aquém da relatada na literatura, de cerca de **50%** (Hassold *et al.*, 1980). No entanto, a maioria dos dados publicados refere-se a abortos espontâneos do primeiro trimestre, enquanto no presente estudo a maioria dos abortos correspondiam a uma idade gestacional superior a 13 semanas, o que poderá explicar uma menor frequência de anomalias cromossómicas como causa de abortos do segundo trimestre.

Pelo mesmo motivo, as frequências de cada anomalia encontrada no presente estudo diferem das relatadas na literatura (Tabela 11).

No entanto, a frequência relativa de cada grupo de anomalias encontrada neste estudo é semelhante à descrita na literatura para anomalias numéricas, sendo apenas significativamente diferente no que concerne às anomalias estruturais. A maior proporção por nós encontrada destas anomalias poderá eventualmente dever-se a uma resolução dos cromossomas, porventura, superior à verificada nos estudos publicados (muitos deles sem bandas de alta resolução) (Tabela 11).

A frequência de casos observados com trissomias 13, 18 ou 21 está de acordo com o publicado (Tabela 12).

No entanto, a frequência observada de casos com trissomia 16 ficou muito aquém do descrito na literatura (Tabela 12), o que se poderá explicar pelo facto de a maioria das amostras utilizadas neste estudo serem provenientes de abortamentos do segundo trimestre, sendo sabido que a frequência de trissomia 16 é muito menor nesse período de gestação do que no primeiro trimestre.

2. Técnicas de Biologia Molecular

Cerca de 60% dos casos de insucesso de estudo por cariótipo foram analisados por técnicas de biologia molecular (MLPA e QF-PCR) – os restantes casos não foram analisados por não existir material biológico disponível – obtendo-se resultados conclusivos em **89,7%** dos casos. Em **10,3%** dos casos não se obtiveram resultados (6 casos - 4,1%) ou obtiveram-se resultados inconclusivos, tendo sido possível apenas a determinação do sexo (9 casos - 6,2%), devido à má qualidade e/ou insuficiente quantidade de amostra (ADN).

Embora as técnicas de biologia molecular não permitam a detecção de todas as anomalias cromossómicas, a frequência de anomalias encontrada por estas técnicas (**28,2%**) não é significativamente diferente, $p > 0,05$ (Tabela 8), da encontrada por citogenética convencional (**32,3%**), o que demonstra a elevada frequência, nestas amostras, das anomalias detectáveis por biologia molecular.

Em abortos espontâneos (excluindo os casos com indicação “Confirmação de DPN”), a frequência de casos com trissomia 13 detectada por biologia molecular é semelhante à encontrada por citogenética convencional e à descrita na literatura (Tabela 12).

No entanto, a frequência das trissomias 18 e 21 é, nestes estudos, significativamente superior à descrita na literatura, baseada em estudos de citogenética convencional (Tabela 12), com $p < 0,05$ (Tabela 14).

Estes dados sugerem que o insucesso de cultura celular poderá estar associado a uma maior incidência de aneuploidias dos cromossomas 18 e 21, pelo que a frequência de anomalias detectada por citogenética convencional em abortos espontâneos poderá estar subestimada (Fritz *et al.*, 2001).

As técnicas de MLPA e QF-PCR identificariam cerca de **60%** das anomalias encontradas por citogenética convencional (Tabela 9), o que se compreende, dado que apenas são detectáveis aneuploidias sexuais, trissomias 13, 18 e 21 e poliploidias.

Dado que estas técnicas se baseiam na comparação de rácios relativas ao produto de amplificação, obtidas para cada cromossoma, situações de mosaicismo poderão não ser correctamente detectadas. De igual modo, as técnicas de MLPA e QF-PCR não permitem a distinção entre trissomias livres e trissomias associadas a rearranjos estruturais.

Com efeito, como foi referido na introdução, indivíduos com rearranjos estruturais equilibrados têm uma grande probabilidade de originar gâmetas desequilibrados e, consequentemente, zigotos desequilibrados, pelo que a distinção entre trissomias livres (em que o risco de recorrência numa gravidez seguinte é inferior a 1%) e trissomias associadas a uma translocação herdada é de grande importância. Assim, em casos com trissomias detectadas apenas por técnicas de biologia molecular, dever-se-á propor a análise de cariótipo em sangue periférico do casal progenitor, no sentido de confirmar a presença de algum rearranjo equilibrado.

Apesar desta limitação, é de sublinhar que apenas foram encontradas trissomias dos autossomas associadas a desequilíbrios estruturais em 5 dos 747 casos analisados (com resultado) por citogenética convencional, o que corresponde a **0,7%** dos casos.

Quanto à análise dos resultados obtidos com diferentes técnicas, de acordo com as principais indicações clínicas, verificou-se que:

1 – Casos com indicação de Aborto Espontâneo (Tabela 10 e Diagrama 2)

- apenas 20% - 30% das anomalias encontradas por citogenética convencional seriam detectáveis por biologia molecular, o que demonstra a quantidade de aneuploidias envolvendo outros cromossomas que não os 13, 18, 21, X e Y (n=17 - **35,4%** do total de trissomias não detectáveis por biologia molecular) e de rearranjos estruturais (n=2 – **6,9%** do total de rearranjos estruturais) presentes neste grupo;
- os casos que seriam, teoricamente, detectados por MLPA e QF-PCR diferem em cerca de 9%, o que explica pelo número de triploidias 69,XXX presentes neste grupo;
- quanto às aneuploidias em mosaico verificadas neste grupo, uma (trissomia do cromossoma 10 em mosaico) não seria detectada por técnicas biologia molecular e as outras cinco (monossomia X em mosaico) poderiam ou não ser detectadas, consoante a percentagem da linha celular anormal do caso em questão, pelo que foram classificadas como “de detecção duvidosa”.

2 – Casos com indicação de Anomalia Fetal (Tabela 10 e Diagrama 3)

- cerca de 50% das anomalias presentes neste grupo seriam detectáveis por biologia molecular, sendo as anomalias não detectáveis sobretudo rearranjos estruturais (n=8 - **27,5%** do total de rearranjos estruturais) e 3 trissomias não pesquisadas por estas técnicas;
- não foram encontradas diferenças entre os resultados obtidos por MLPA e QF-PCR, o que apenas traduz a ausência total de triploidias 69,XXX neste grupo;
- 1 caso de monossomia X em mosaico poderia ser ou não detectado, consoante a percentagem da linha celular anormal, pelo que foi classificado como “de detecção duvidosa”.

3 – Casos com indicação de Idade Materna Avançada (Tabela 10 e Diagrama 4)

- cerca de 40% das anomalias presentes neste grupo seriam detectáveis por biologia molecular, o que mostra que, mesmo neste grupo (em que se esperaria uma maior prevalência de trissomias 13, 18 e 21), se verifica uma forte presença de aneuploidias envolvendo outros cromossomas que não os 13, 18 e 21 (n=17 – **35,4%** do total de trissomias não detectáveis) e de rearranjos estruturais (n=3 – **10,3%** do total de rearranjos estruturais);
- não foram encontradas diferenças entre os resultados obtidos por MLPA e QF-PCR, o que apenas traduz a ausência total de triploidias 69,XXX;
- 1 caso de trissomia 21 em mosaico poderia ou não ser detectado por biologia molecular, consoante a percentagem da linha celular anormal do caso em questão, pelo que foi classificado como “de detecção duvidosa”;
- apesar da elevada proporção de trissomias não detectáveis por biologia molecular (nomeadamente trissomias 15, 16 e 22), foram detectadas 11 (**32,4%**) anomalias em 31 casos com resultado conclusivo por MLPA/QF-PCR, um valor mais elevado do que nos casos com indicação de Aborto Espontâneo ou mesmo no total dos casos analisados por técnicas de biologia molecular, como seria de esperar neste grupo.

Em conclusão, apesar de os marcadores genéticos utilizados nas técnicas de biologia molecular (MLPA e QF-PCR) não detectarem uma percentagem considerável de anomalias cromossómicas, permitem porém a obtenção de um resultado conclusivo ou, pelo menos, da exclusão das anomalias que conseguem identificar nos casos em que, devido ao insucesso de cultura celular, não haveria qualquer informação

A identificação da causa de uma perda fetal é fulcral para o casal na procura de tranquilidade psicológica (a médio e longo prazos), na avaliação do risco de um novo abortamento e, portanto, para melhorar o aconselhamento genético em gravidezes subsequentes (Nikcevic *et al.*, 1999; Carp *et al.*, 2001).

A importância da identificação de anomalias cromossómicas nos produtos de abortamento, para avaliar o risco de aneuploidias em futuras gestações é compreensivelmente menor no caso de grávidas que pertencem a um grupo com indicação para Diagnóstico Pré-Natal (DPN) - com idade materna avançada, em processos reprodução medicamente assistida, com rastreio bioquímico positivo para trissomias 13, 18 e/ou 21, com anomalias ecográficas, entre outros -, já que qualquer desequilíbrio seria identificável em DPN.

As técnicas de biologia molecular aqui descritas são rápidas, baratas (comparativamente à citogenética convencional) e de fácil execução, obtendo-se resultados em 24h a 48h (será possível, por vezes, obter resultados em menos de 24h).

Comparativamente à QF-PCR, que aparentemente será mais completa do que a MLPA por detectar triploidias 69,XXX e contaminação materna e por permitir a identificação da origem de material genético extra, a MLPA tem sobre aquela técnica algumas vantagens de importância a valorizar:

- é mais rápida;
- utiliza 8 marcadores genéticos (sondas) para cada cromossoma, em oposição aos 3/4 utilizados em QF-PCR, o que traz uma maior segurança de resultados, uma mais fácil e correcta interpretação de rácios e uma maior probabilidade de detecção de aneuploidias parciais;
- utiliza marcadores que se localizam fora dos locais de polimorfismos conhecidos, ao contrário da QF-PCR que utiliza sondas polimórficas, evitando os resultados não informativos dos fenómenos, já descritos, que daí advêm.

Para além das técnicas estudadas neste trabalho, existem outros testes de biologia molecular utilizados para o mesmo objectivo apresentado, como a **FISH** (*Fluorescent in situ hybridization*) e a **CGH** (*Comparative Genomic Hybridization*).

A introdução da técnica de FISH veio aumentar o limite de resolução alcançado pela análise por citogenética convencional e permitir a pesquisa rápida de aneuploidias em núcleos interfásicos, sendo já uma técnica de diagnóstico reconhecida. Esta técnica baseia-se na utilização de sondas (sequências conhecidas de ADN) marcadas com fluorescência e respectiva hibridação em núcleos interfásicos. O número de sondas hibridizadas corresponderá ao número de cópias da sequência em questão presentes naquela célula. Por visualização das sondas marcadas num microscópio óptico de fluorescência poder-se-ão detectar as aneuploidias correspondentes aos cromossomas nos quais estão presentes as sequências de ADN com as quais a sonda hibridizou: dois sinais de fluorescência corresponderão a duas cópias desse cromossoma (normal) e, por exemplo, três sinais de fluorescência corresponderão a uma trissomia (três cópias) do cromossoma em questão. Existe, hoje, uma grande variedade de sondas que permitem a detecção específica de aneuploidias e/ou rearranjos estruturais (sondas centroméricas, sondas sub-teloméricas, sondas de sequência única (*locus*-específicas) e sondas de pintura cromossómica). A principal desvantagem desta técnica é a de não distinguir desequilíbrios fora dos locais de hibridação da sonda.

A técnica de CGH, por seu lado, permite a identificação de desequilíbrios ao longo de todo o genoma. Esta técnica baseia-se na extracção de ADN de um indivíduo controle com cariótipo normal conhecido e de um outro (o que se quer conhecer) de cariótipo desconhecido. As duas amostras de ADN são marcadas com dois fluorocromos diferentes e co-hibridizadas a cromossomas de metafases provenientes de um cariótipo normal conhecido. As diferenças de intensidade de fluorescência ao longo de cada cromossoma identificarão desequilíbrios genómicos: um maior pico de intensidade de fluorescência do fluorocromo correspondente ao nosso sujeito, por exemplo, corresponderá a um aumento de material genético nesse cromossoma, permitindo, assim, a identificação de desequilíbrios. Para além de depender do nível de resolução dos cromossomas aos quais são hibridizadas as amostras, a CGH também não identifica rearranjos equilibrados ou poliploidias (Shaffer, 2007).

A optimização da técnica de CGH – *array-CGH*, que substitui os cromossomas em metafase pela utilização de clones de fragmentos de ADN conhecidos – conduz a um aumento de sensibilidade, resolução e facilidade de execução tais que alguns autores (Benkhalifa *et al.*, 2005) sugerem que esta poderá, num futuro próximo, ser técnica de

rotina em laboratórios de citogenética clínica, em áreas como a do diagnóstico pré-implantatório, da citogenética do cancro e de produtos de abortamento, entre outras. No entanto, a **array-CGH** obriga a técnicas laboratoriais e sistemas de análise altamente especializados, pelo que a sua implementação em laboratório exige um enorme esforço, quer a um nível técnico, quer a um nível económico (Fritz *et al.*, 2001).

Embora em grande expansão ao nível de sensibilidade e resolução, estas técnicas são, comparativamente à MLPA e QF-PCR, francamente mais dispendiosas, requerem mais tempo e material e só permitem a análise de um caso de cada vez.

As técnicas de MLPA e QF-PCR anunciam-se com uma importância reconhecida nas situações apresentadas, no entanto, a optimização destes testes é essencial.

Optimizações propostas:

1 – em QF-PCR será importante a melhoria de resultados através da utilização de marcadores para os cromossomas 15, 16, e 22, que representam uma proporção elevada de trissomias reconhecidas em produtos de abortamento, sendo que a trissomia 15 se apresenta com a mesma frequência da do cromossoma 16 (2,0%) e a trissomia 22 se apresenta com a mesma frequência da do cromossoma 18 (1,3%). Deste modo, poderá ser importante a construção de uma *mix* que contenha, para além dos já existentes, marcadores para estes cromossomas, a ser utilizada em produtos de abortamento.

2 – em MLPA será importante a optimização do protocolo da utilização de marcadores sub-teloméricos [*probe-mix* P036B e P070 (MRC-Holland),] em oposição aos marcadores centroméricos utilizados neste trabalho (SALSA MLPA KIT P001 Trisomy), já que abrange todos os cromossomas e permite, teoricamente, a detecção de todas as aneuploidias completas, uma proporção importante de aneuploidias parciais e rearranjos desequilibrados envolvendo as regiões terminais dos cromossomas (por vezes não detectáveis por citogenética convencional) (Diego-Alvarez *et al.*, 2007).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ADINOLFI M, PERTL B, SHERLOCK PB: *Rapid detection of aneuploidies by microsatellite and the quantitative fluorescent polymerase chain reaction*. Prenat Diagn, Vol 17:13: 1299-1311, 1997

ADINOLFI M, SHERLOCK J, CIRIGLIANO V, PERTL B: *Prenatal screening for aneuploidies by Quantitative Fluorescent Polymerase Chain Reaction*. Community Genet, Vol. 3: 50-60, 2000

ALLEN SK, LUHARIA A, GOULD CP, MACDONALD F, LARKINS S, DAVISON EV: *Short communication: Rapid prenatal diagnosis of common trisomies: discordant results between QF-PCR analysis and karyotype analysis on long-term culture for a case of trisomy 18 detected in CVS*. Prenat Diagn, Vol 26: 1160-1167, 2006

ANDONOVA S, VAZHAROVA R, DIMITROVA V, MAZNEIKOVA V, TONCHEVA D & KREMENSKY I: *Introduction of the QF-PCR analysis for the purposes of prenatal diagnosis in Bulgaria--estimation of applicability of 6 STR markers on chromosomes 21 and 18*. Prenat Diagn Vol 24: 202-8, 2004

BALLIF BC, KASHORK CD, SALEKI R, ROREM E, SUNDIN K, BEJJANI BA, SHAFFER LG: *Detecting sex chromosome anomalies and common triploidies in products of conception by array-based comparative genomic hybridization*. Prenat Diagn (in press), Published online in Wiley InterScience, DOI: 10.1002/pd.1411, 2006

BENKHALIFA M, KASAKYAN S, CLEMENT P, BALDI M, TACHDJIAN G, DEMIROL A, GURGAN T, FIORENTINO F, MOHAMMED M, QUMSIYEH MB: *Array comparative genomic hybridization profiling of first-trimester spontaneous abortions that fail to grow in vitro*. Prenat Diagn, Vol 25: 894-900, 2005

BRUNO DL, BT, NOURI S, PERTILE MD, FRANCIS DI, NORRIS F, KENNEY BK, SCHOUTEN J, CHOO KHA, SLATER HR: *High-throughput analysis of chromosome abnormality in spontaneous miscarriage using MLPA subtelomere assay with an ancillary FISH test for poliploidy*. Am. J. Med. Genet. Part A, 140A: 2786-2793, 2006

CARP H, FELDMAN B, OELSENER G, SCHIFF E: *Parental Karyotype and subsequent live births in recurrent miscarriage*. Fertil Steril, May;81(5): 1296-1301, 2004

CARP H, TODER V, AVIRAM A, DANIELY M MASHIACH S, BARKAI G: *Karyotype of the abortus in recurrent miscarriage*. Fertil Steril, 75, 678-682, 2001

CELEP F, KARAGUSEL A, OZEREN M, BOZKAYA H: *The frequency of chromosomal abnormalities in patients with reproductive failure*, European Journal of Obstetrics & Gynecology and Reproductive Biology, 127, 106-109, 2006

CIRIGLIANO V, EJARQUE M, CAÑADAS MP, LLOVERAS E, PLAJA A, PEREZ M, FUSTER C, EGOZCUE J: *Clinical application of multiplex quantitative fluorescent polymerase Chain reaction (QF-PCR) for the rapid prenatal detection of common chromosome aneuploidies*. Molecular Human Reproduction, Vol. 7, No 10: 1001-1006, 2001

CIRIGLIANO V, EJARQUE M, FUSTER C, ADINOLFI M: *X chromosome dosage by quantitative fluorescent PCR and rapid prenatal diagnosis of sex chromosome aneuploidies*. Molecular Human Reproduction, Vol 8, No 11: 1042-1045, 2002

CLIFFORD K, RAI R, WATSON H, REGAN L: *An informative protocol for the investigation of recurrent miscarriage : preliminary experience of 500 consecutive cases*. Hum. Reprod., Jul; 9(7): 1328-1332, 1994

DE BRAEKELEER M, DAO TN: *Cytogenetic studies in couples experiencing repeated pregnancy losses*. Hum. Reprod., Jul;5 (5): 519-528, 1990

DIEGO-ALVAREZ D, GARCIA-HOYOS M, TRUJILLO MJ, GONZALEZ-GONZALEZ C, RODRIGUEZ DE ALBA M, AYUSO C, RAMOS-CORRALES C, LORDA-SANCHEZ I: *Application of quantitative fluorescent PCR with short tandem repeat markers to the study of aneuploidies in spontaneous miscarriages*. Hum. Reprod., Vol 20, No 5: 1235-1243, 2005

DIEGO-ALVAREZ D, RAMOS-CORRALES C, GARCIA-HOYOS M, BUSTAMANTE-ARAGONES A, CANTALAPIEDRA D, DIAZ-RECASENS J, VALLESPIN-GARCIA E, AYUSO C, LORDA-SANCHEZ I: *Double trisomy in spontaneous miscarriage: cytogenetic and molecular approach*. Hum. Reprod., Vol. 21, No 4: 958-966, 2005

DIEGO-ALVAREZ, D, RODRIGUEZ DE ALBA, M, CARDERO-MERLO, R, DIAZ-RECASENS, J, AYUSO, C, RAMOS, C & LORDA-SANCHEZ, I: *MLPA as a screening method of aneuploidy and unbalanced chromosomal rearrangements in spontaneous miscarriages*. Prenat Diagn, Vol 27: 765-771, 2007

DONAGHUE C, MANN K, DOCHERTY Z, OGILVIE CM: *Detection of mosaicism for primary trisomies in prenatal samples by QF-PCR and karyotype analysis*. Prenat Diagn, 25: 65-72, 2005

DUBEY S, CHOWDHURY MR, PRAHLAD B, KUMAR V, MATHUR R, HAMILTON S, KABRA M, MENON P SN, VERMA IC: *Cytogenetic causes for recurrent spontaneous abortions - An experience of 742 couples (1484 cases)*, Indian Journal of Human Genetics, Vol 11, No 2: 94-98, 2005

FERRE F: *Quantitative or semi-quantitative PCR reality versus myth, PCR methods and applications*. 2, 1-9, 1992

FRASSEN MT, KJ, VAN D V, LESCHOT NJ, BOSSUYT PM, GODDIJN M: *Reproductive outcome after chromosome analysis in couples with two or more miscarriages: index (corrected)-control study*. BMJ, April 1; 332(7544): 759-763, 2006

FRITZ B, HALLERMANN C, OLERT J, FUCHS B, BRUNS M, ASLAN M, SCHMIDT S, COERT W, MUNTEFERING H, REHDER H: *Cytogenetic analyses of culture failures by comparative genomic hybridisation (CGH) – Re-evaluation of chromosome aberration rates in early spontaneous abortions*. European Journal of Human Genetics, 9, 539-547, 2001

GARDNER, R J McKinlay; SUTHERLAND, Grant R: Chapters 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 12, 13, 17, 21, in: “Chromosome abnormalities and genetic counselling.” Oxford University Press, 2004.

GERDES T., KM, LIND AM, VESTERGAARD LARSEN G, KJAERGAARD S: *Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) in prenatal diagnosis - experience of a large series of rapid testing for aneuploidy of chromosomes 13, 18, 21, X and Y*. Prenat Diagn, 28: 1119-1125, 2008

GROUP, TECW: *Genetic aspects of female reproduction*. Human Reproduction Update: 1-15, 2008

GROUP, UMD: *A collection of ordered tetranucleotide-repeat markers from the human genome*. Am. J. Hum. Genet, 57 (3): 619-28, 1995,

JUNQUEIRA, LCU; CARNEIRO, JP: Chapter 2, in: “Biologia molecular e celular.” Edições Guanabara, 4ª edição, 1987.

HANSMANN I: *Clustering of chromosomal aneuploidy and tracing nondisjunction in man*. Environ Health Perspect , Aug:31 23-5, 1997

HASSOLD T., CN, FUNKHOUSER J. ET AL.: *A cytogenetic study of 1000 spontaneous abortions*. Ann. Hum. Gene.,44: 151-178, 1980

HOGGE WA; BYRNES AL.; LANASA MC.; SURTI U.; *The clinical use of karyotyping spontaneous abortions*. American Journal of Obstetric Gynecology, 189: 397-402,2003

HORNE AW, ALEXANDER CI: *Recurrent miscarriage*. J. Fam. Plann Reprod. Health Care, 31 (2): 103-107, 2005

JUNQUEIRA, LCU; CARNEIRO, JP: Chapter 2, in: “Biologia molecular e celular.” Edições Guanabara, 4ª edição, 1987.

KAJII T, FERRIER A NIIKAWA N, TAKAHARA H, OHAMA K, AVIRACHAN S: *Anatomic and chromosomal abnormalities in 639 spontaneous abortions*. Hum Genet 55:87-98, 1980

KAJII T, OHAMA K, NIIKAWA N, FERRIER A, AVIRACHAN S: *Banding analysis of abnormal karyotypes in spontaneous abortion*. Am j Hum Genet, 25:539-547, 1973

KOOPER AJA, FBHWK-BE, FEUTH T., JANSSEN J.C.A., VAN DER BURGT I., LOTGERING F.K., VAN KESSEL A.G., SMITS A.P.: *Multiplex ligation-dependent probe amplification (MLPA) as a stand-alone test for rapid aneuploidy detection in amniotic fluid cells*. Prenat Diagn, 28: 1004-1010, 2008

KOZLOWSKI P, JASINSKA A, KWIATKOWSKI DJ: *New applications and development in the use of multiplex ligation-dependent probe amplification*. Electrophoresis, 29: 4627-4636, 2008

LAURITSEN JG: *Aetiology of spontaneous abortions: A cytogenetic and epidemiological study of 288 abortuses and their parents*. Acta. Obstet. Gynecol. Scand. Suppl., 52: 1-29, 1976

LATHI RB, MARK SD, WESTPHAL LM, MILKI AA: *Cytogenetic testing of anembryonic pregnancies compared to embryonic missed abortion*. J Assist Genet, 24:251-254, 2007

LATHI RB, MILKI AA: *Short Communication: Tissue sampling technique affects accuracy of karyotype from missed abortions*. Journal of Assisted Reproduction and Genetics, Vol 19, No 11, 2002

LEBEDEV I: *Commentary: Molecular cytogenetics of recurrent missed abortions*. Indian J Med Res, 124, 9-10, 2006

LJUNGER E, CNATTINGIUS S, LUNDIN C, ANNEREN G: *Chromosomal anomalies I first-trimester miscarriages*. Acta Obstet Gynecol Scand, 84: 1103-1107, 2005

LORDA-SANCHEZ, I, DIEGO-ALVAREZ, D, AYUSO, C, DE ALBA, MR, TRUJILLO, MJ & RAMOS C: *Trisomy 2 due to a 3:1 segregation in an abortion studied by QF-PCR and CGH*. Prenat Diagn, 25: 934-8, 2005

LOMAX B, TANG S, SEPAROVIC E, PHILIPS D, HILLARD E, THOMSON T, KALOUSEK DK: *Comparative genomic hybridization in combination with flow cytometry improves results of cytogenetic analysis of spontaneous abortions*. Am J Hum Genet. May;66(5):1516-21, 2000

MANN K, FOX SP, ABBS AJ, YAU SC, DOCHERTY Z, OGILVIE CM: *Development and implementation of a new rapid aneuploidy diagnostic service within the UK National Health Care Service and implications for the future of prenatal diagnosis*. Lancet, Vol. 358: 1057-61, 2001

MANSFIELD ES: *Diagnosis of Down's Syndrome and other aneuploidies using quantitative polymerase chain reaction and small tandem repeat polymorphism*. Hum. Mol. Genet, Jan 2(1): 43-50, 1993

MORAES AC, MORONAF, HASHIMOTO EM, SILVA ID, TORIONI MR, SOUZA MM, PATRICIO FR: *Cytogenetic and molecular evaluation of spontaneous abortion samples*. Rev Bras Ginecol Obstet, Vol 27, No 9, 2005

MORALES C., SA, BRUGUERA J., MARGARIT E., BORRELL A., BOROBIO V., SOLER A: *Cytogenetic study of spontaneous abortions using semi-direct analysis of chorionic villi samples detects the broadest spectrum of chromosome abnormalities*. Am. J. Med. Genet. Part A 146A: 66-70, 2008

MUNNE S, ET, SANDALINAS M, SABLE D, COHEN J: *Gamete segregation in female carriers of Robertsonian translocations*. Cytogenet Cell Genet, 90(3-4): 303-08, 2000

NAGAISHI M, YAMAMOTO T, IINUMA K, SHIMOMURA K, BERENDSA KNOPS J: *Chromosome abnormalities identified in 347 spontaneous abortions collected in Japan*. J Obstet Gynaecol Res, Vol 30, No 3: 237-241, 2004

NICOLAIDIS P, PETERSEN MB: *Origin and mechanisms of non-disjunction in human autosomal trisomies*. Human Reproduction, Vol 13, No 2: 313-319, 1998

NICOLINI U., LF, NATACCI F., CURCIO AND THE-HUNG BUI: *The introduction of QF-PCR in prenatal diagnosis of foetal aneuploidies: time for reconsideration*. Human Reproduction Update, Vol 10, No 6: 541-548, 2004

NIKCEVIC AV, TUNFEL SA, KUCZMIERCZYK AR, NICOLAIDES KH: *Investigation of the cause of miscarriage and its influence on women's psychological distress*. Br J Obstet Gynaecol, 106,808-813, 1999

NYBO ANDERSEN AM, WOHLFARHRT J, CHRISTEN P, OLSEN J, MELBEYE M.: *Maternal age and foetal loss: population based register linkage study*. BMJ: Vol 320: 1708-1712, 2000

OHLEIR LD, ZOLLO M, MANSFIELD ES, ROSE EA: *Use of a sensitive fluorescent intercalating dye to detect PCR products of low copy number and high molecular weight*. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Vol 3: 115-119, 1993

PERTL B, KOPP S, KROISEL PM, HAUSLER M, SHERLOCK J, WINTER R, ADINOLFI M: *Quantitative fluorescence polymerase chain reaction for the rapid prenatal detection of common aneuploidies and foetal sex*. Am J Obstet Gynecol. Oct; 177(4): 899-906, 1997

RAI R., REGAN L: *Recurrent miscarriage*. Lancet, Vol. 368: 601-611, 2006

RAY R, SIM R, KHAN K, COOPER P, POUNDER R, WAKEFIELD A: *Direct in situ nucleic acid amplification: control of artefact and use of labelled primers*. Clin Mol Path, Dec;49(6):M345-M350, 1996

REGATEIRO, FJ, Chapters XII(2), XIV(2) XXII, in: "Manual de genética médica." Coimbra, Imprensa da Universidade, 2003.

RIOS A, FURDON SA, RNC, MS, NNP, ADAMS D, CLARK DA: *Recognizing the clinical features of Trisomy 13 Syndrome*. Advances in Neonatal Care, Vol 4, No 6, 332-343, 2004

SHAFFER LG, BT-H: *Molecular cytogenetic and rapid aneuploidy detection methods in prenatal diagnosis*. Am. J. Med. Genet. Part C Semin. Med. Genet 145C: 87-98, 2007

SHERLOCK J, CIRIGLIANO V, PETROU M, TUTSCHER B, ADINOLFI M: *Assessment of diagnostic quantitative fluorescent multiplex polymerase chain reaction assays performed on single cells*. Ann. Hum. Genet, Vol. 62: 9-23, 1998

SHI Q, SPRIGGS E, FIELD LL., RADEMAKER A, BARCLAY L, MARTIN RH: *Absence of age effect on meiotic recombination between human X and Y chromosomes*. American Journal of Human Genetics, Aug;71(2):254-61, 2002

SLATER HR, BRUNO DL, REN H, PERTILE M, SCHOUTEN JP, CHOO KHA: *Rapid high throughput prenatal detection of aneuploidy using a novel quantitative method (MLPA)*. J Med Genet, Vol 40: 907-912, 2003

STANSFIELD, William D; SALOMÉ, Jaime S; CANO, Raúl J: Chapter 3, in: "Biologia molecular e celular." Editora McGraw-Hill de Portugal, 1998.

STEPHENSON MD, SIERRA S: *Reproductive outcomes in recurrent pregnancy loss associated with a parental carrier of a structural chromosome rearrangement*. Hum. Reprod, Vol 21, No 4: 1076-1082, 2006

THOMAS NS, ENIS S, SHARP AJ, DURKIE M, HASSOLD TJ, COLLINS AR, JACOBS PA: *Maternal sex chromosome non-disjunction: evidence for X chromosome-specific risk factor*. Human Molecular Genetics, Vol 10, No 3, 243-250, 2001

WARBURTON D: *2006 William Allan Award Address: Having it all*. Am. J. Hum. Genet: Vol 81, No 4: 648-646, 2007.

WATERS JJ, MANN K, GRIMSLEY L, OGILVIE CM, DONAGUE C, STAPLES L, HILLS A, ADAMS T, WILSON C: *Complete discrepancy between QF-PCR analysis of uncultured villi and karyotyping of cultured cells in the prenatal diagnosis of trisomy 21 in three CVS*. Prenat Diagn, Vol 27: 332-339, 2007

WATERS JJ, WALSH S, LEVETT LJ, LIDDLE S, AKINFENSA Y: *Short communication: Complete discrepancy between abnormal foetal karyotypes predicted by QF-PCR rapid testing and karyotyped cultured cells in a first-trimester CVS*. Prenat Diagn, Vol 26: 892-897, 2006

Websites

- 1 - www.wikipedia.com
- 2 - www.members.cox.net
- 3 - www.ffsvirus.vilabol.uol.com.br
- 4 - www.uic.edu/.../bios100/lecturesf04am/lect16.htm
- 5 - www.biologycorner.com (imagem)
- 6 - faculty.ircc.cc.fl.us/FACULTY/TFischer/images

- 7 - porpax.bio.miami.edu/.../150/mendel/heredity.htm
- 8 - www.accessexcelence.org (imagem)
- 9 - www.chromodisorder.org (imagem)
- 10 - www.answers.com (imagem)
- 11 - www.emc.maricopa.edu (imagem)
- 12 - www.ucl.ac.uk/~ucbhjow/b241/techniques.html
- 13 - www.cerbafaso.org/.../html.index.htm
- 14 - www.mlpa.com
- 15 - www.biology.about.com
- 16 - www.users.rcn.com
- 17 - www.yorku.ca
- 18 - www.fig.cox.miami.edu

ANEXOS

Tabela 15 - Avaliação estatística da diferença na detecção de anomalias identificadas por técnicas de citogenética convencional e de biologia molecular, em aborto espontâneo (Teste Chi Quadrado)

Técnica * Normal Crosstabulation					
			Normal		
			0	1	Total
Técnica	Citogenética Convencional	Count	48	494	542
		Expected Count	62,1	479,9	542,0
		% of Total	7,2%	74,5%	81,7%
	Biologia Molecular	Count	28	93	121
		Expected Count	13,9	107,1	121,0
		% of Total	4,2%	14,0%	18,3%
	Total	Count	76	587	663
		Expected Count	76,0	587,0	663,0
		% of Total	11,5%	88,5%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	19,887 ^a	1	,000		
Continuity Correction ^b	18,505	1	,000		
Likelihood Ratio	16,931	1	,000		
Fisher's Exact Test				,000	,000

a. 0 cells (,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 13,87.

b. Computed only for a 2x2 table

Tabela 16 – Avaliação estatística da diferença de detecção de trissomias 13 entre as técnicas de citogenética convencional e de biologia molecular, em aborto espontâneo (Teste Chi Quadrado)

Técnica * Tris 13 Crosstabulation			Tris 13		
			0	1	Total
Técnica	Citogenética Convencional	Count	537	5	542
		Expected Count	537,1	4,9	542,0
		% of Total	81,0%	,8%	81,7%
	Biologia Molecular	Count	120	1	121
		Expected Count	119,9	1,1	121,0
		% of Total	18,1%	,2%	18,3%
	Total	Count	657	6	663
		Expected Count	657,0	6,0	663,0
		% of Total	99,1%	,9%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	,010 ^a	1	,920		
Continuity Correction ^b	,000	1	1,000		
Likelihood Ratio	,010	1	,919		
Fisher's Exact Test				1,000	,698

a. 2 cells (50,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 1,10.

b. Computed only for a 2x2 table

Tabela 17 – Avaliação estatística da diferença na detecção de trissomias 18 entre as técnicas de citogenética convencional e de biologia molecular, em abortos espontâneos (Teste Chi Quadrado)

Técnica * Tris 18 Crosstabulation					
			Tris 18		
			0	1	Total
Técnica	Citogenética Convencional	Count	534	8	542
		Expected Count	530,6	11,4	542,0
		% of Total	80,5%	1,2%	81,7%
	Biologia Molecular	Count	115	6	121
		Expected Count	118,4	2,6	121,0
		% of Total	17,3%	,9%	18,3%
	Total	Count	649	14	663
		Expected Count	649,0	14,0	663,0
		% of Total	97,9%	2,1%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	5,804 ^a	1	,016		
Continuity Correction ^b	4,242	1	,039		
Likelihood Ratio	4,638	1	,031		
Fisher's Exact Test				,028	,028

a. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 2,56.

b. Computed only for a 2x2 table

Tabela 18 – Avaliação estatística da diferença na detecção de trissomias 21 entre as técnicas de citogenética convencional e de biologia molecular, em aborto espontâneo (Teste Chi Quadrado)

Técnica * Tris 21 Crosstabulation					
			Tris 21		
			0	1	Total
Técnica	Citogenética Convencional	Count	531	11	542
		Expected Count	526,5	15,5	542,0
		% of Total	80,1%	1,7%	81,7%
	Biologia Molecular	Count	113	8	121
		Expected Count	117,5	3,5	121,0
		% of Total	17,0%	1,2%	18,3%
	Total	Count	644	19	663
		Expected Count	644,0	19,0	663,0
		% of Total	97,1%	2,9%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	7,461 ^a	1	,006		
Continuity Correction ^b	5,905	1	,015		
Likelihood Ratio	6,001	1	,014		
Fisher's Exact Test				,012	,012

a. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,47.

b. Computed only for a 2x2 table

Tabela 19 – Avaliação estatística da diferença na detecção de monossomia X entre as técnicas de citogenética convencional e de biologia molecular, em aborto espontâneo (Teste Chi Quadrado)

Técnica * 45,X Crosstabulation					
			45,X		
			0	1	Total
Técnica	Citogenética Convencional	Count	530	12	542
		Expected Count	526,5	15,5	542,0
		% of Total	79,9%	1,8%	81,7%
	Biologia Molecular	Count	114	7	121
		Expected Count	117,5	3,5	121,0
		% of Total	17,2%	1,1%	18,3%
	Total	Count	644	19	663
		Expected Count	644,0	19,0	663,0
		% of Total	97,1%	2,9%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	4,532 ^a	1	,033		
Continuity Correction ^b	3,340	1	,068		
Likelihood Ratio	3,773	1	,052		

a. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,47.

b. Computed only for a 2x2 table

Tabela 20 - Avaliação estatística da diferença de detecção de poliploidias entre as técnicas de citogenética convencional e de biologia molecular, em aborto espontâneo (Teste Chi Quadrado)

Técnica * Poliploidia Crosstabulation					
			Poliploidia		
			0	1	Total
Técnica	Citogenética Convencional	Count	530	12	542
		Expected Count	527,3	14,7	542,0
		% of Total	79,9%	1,8%	81,7%
	Biologia Molecular	Count	115	6	121
		Expected Count	117,7	3,3	121,0
		% of Total	17,3%	,9%	18,3%
	Total	Count	645	18	663
		Expected Count	645,0	18,0	663,0
		% of Total	97,3%	2,7%	100,0%

Chi-Square Tests

	Value	df	Asymp. Sig. (2-sided)	Exact Sig. (2-sided)	Exact Sig. (1-sided)
Pearson Chi-Square	2,821 ^a	1	,093		

a. 1 cells (25,0%) have expected count less than 5. The minimum expected count is 3,29.

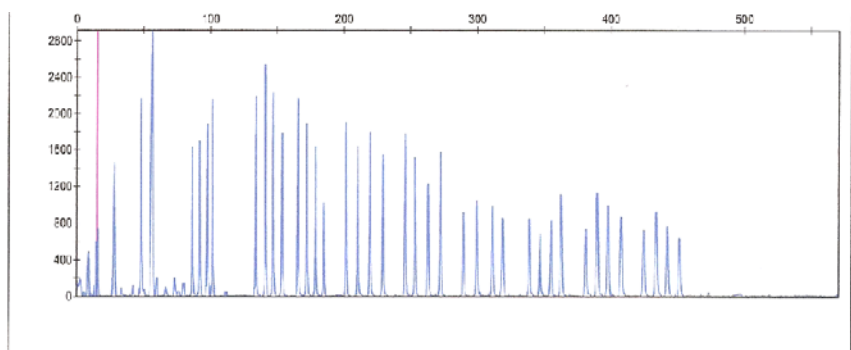
b. Computed only for a 2x2 table

Caso nº1 –Exemplo Resultado MLPA 46,XX

Area total 353138

Crom	Size	Area	Area rel			
13	146.92	14253	0,040375			
13	178.8	11227	0,031792			
13	219.69	13539	0,038339			
13	263.07	10229	0,028966	0,030555	18/13	21/13
13	311.41	8893	0,025183		1,1	1,0
13	355.23	8737	0,024741			
13	397.99	10499	0,029731			
13	442.36	8940	0,025316			
18	140.98	16257	0,046038			
18	172.11	12901	0,036532			
18	210.58	12334	0,034927	0,035495	18/21	18/X
18	253.11	12547	0,03553		1,1	1,1
18	299.59	9470	0,026842			
18	347.19	7294	0,020655			
18	389.94	12491	0,035371			
18	434.04	11325	0,03207			
21	134.07	14375	0,040706			
21	165.59	14755	0,041783			
21	201.69	13445	0,038073			
21	246.07	14186	0,040171	0,031784		
21	289.75	7577	0,021739			
21	338.93	8350	0,023645		21/X	
21	381.52	8248	0,023358		1,1	
21	424.76	8757	0,024798			
X	153.75	11786	0,033375			
X	184.94	7038	0,01993			
X	229.14	12208	0,03457			
X	272.36	13235	0,037478	0,029165		
X	318.89	8579	0,024294			
X	362.73	11470	0,03248			
X	407.75	10214	0,028924			
X	451.53	7865	0,022272			

FICHEIRO EXCEL



	Dye/Sample Peak	Sample File Name	Size	Height	Area
1	B,83	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	134.07	2203	14375
2	B,84	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	140.96	2545	16257
3	B,85	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	146.92	2240	14258
4	B,87	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	153.75	1794	11786
5	B,89	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	165.59	2174	14755
6	B,90	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	172.11	1905	12901
7	B,91	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	178.8	1650	11227
8	B,93	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	184.94	1033	7038
9	B,96	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	201.69	1917	13445
10	B,98	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	210.58	1657	12334
11	B,99	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	219.69	1809	13539
12	B,100	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	229.14	1580	12208
13	B,103	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	246.07	1783	14186
14	B,104	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	253.11	1529	12547
15	B,105	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	263.07	1242	10229
16	B,106	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	272.36	1585	13235
17	B,107	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	289.75	922	7677
18	B,108	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	299.59	1055	9479
19	B,110	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	311.41	989	8893
20	B,111	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	318.89	863	8579
21	B,115	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	338.93	859	8350
22	B,117	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	347.19	699	7294
23	B,118	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	355.23	837	8737
24	B,120	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	362.73	1122	11470
25	B,121	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	381.52	748	8248
26	B,122	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	389.94	1143	12491
27	B,124	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	397.99	999	10499
28	B,126	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	407.75	886	10214
29	B,127	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	424.76	730	8757
30	B,128	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	434.04	940	11325
31	B,129	62400 la9-25-09-4-12 PM.fsa	442.36	781	8940

Mon Sep 28,2009 10:06AM, ISI

Printed by: Sequencer

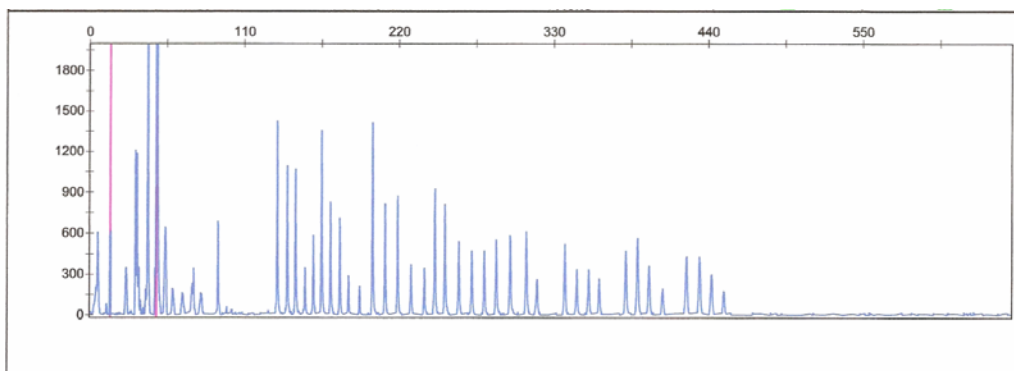
Page 1 of 2

ELECTROFOROGRAMA

Caso nº2 – Exemplo Resultado MLPA 47,XY,+21

Area tot. 179697					
Cromoss.	Size	Area	Area rel.		
13	146.73	7505	0,041765	0,028257	18/13
13	178.26	5150	0,028659		21/13
13	219.35	6844	0,038086		1,2
13	262.81	4682	0,026055		1,4
13	310.87	5476	0,030474		
13	355.26	3597	0,020017		
13	398.22	3943	0,021942		
13	442.66	3425	0,01906		
18	140.86	7409	0,041231	0,032537	21/18
18	171.59	6044	0,033634		1,2
18	210.44	6438	0,035827		
18	252.93	6907	0,038437		
18	299.35	5389	0,029989		
18	346.84	3499	0,019472		
18	390.09	6219	0,034608		
18	433.95	4870	0,027101		
21	133.67	9895	0,055065	0,040609	
21	165.23	9982	0,055549		
21	201.38	10758	0,059867		
21	245.84	7769	0,043234		
21	289.56	5042	0,028058		
21	338.31	4980	0,027713		
21	381.73	5063	0,028175		
21	424.9	4890	0,027212		
X	153.44	2529	0,014074	0,014944	
X	184.44	2204	0,012265		
X	228.97	3092	0,017207		
X	271.93	4157	0,023133		X/Y
X	318.52	2776	0,015448		1,2
X	362.72	2706	0,015059		
X	408.0	2099	0,011681		
X	451.62	1920	0,010685		
Y	159.4	4142	0,02305	0,017304	
Y	192.41	1517	0,008442		
Y	238.45	2792	0,015537		
Y	281.01	3987	0,022187		

FICHEIRO EXCEL



		Dye/Sample Peak	Sample File Name	Size	Height	Area
1		B,27	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	133.67	1431	9895
2		B,28	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	140.86	1097	7409
3		B,29	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	146.73	1075	7505
4		B,30	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	153.44	352	2529
5		B,31	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	159.4	591	4142
6		B,32	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	165.23	1362	9982
7		B,33	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	171.59	832	6044
8		B,34	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	178.26	716	5150
9		B,35	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	184.44	293	2204
10		B,36	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	192.41	214	1517
11		B,37	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	201.38	1420	10758
12		B,38	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	210.44	818	6438
13		B,39	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	219.35	879	6844
14		B,40	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	228.97	375	3092
15		B,41	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	238.45	346	2792
16		B,42	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	245.84	932	7769
17		B,43	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	252.93	815	6907
18		B,44	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	262.81	543	4682
19		B,45	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	271.93	473	4157
20		B,46	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	281.01	474	3987
21		B,47	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	289.56	557	5042
22		B,48	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	299.35	589	5389
23		B,49	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	310.87	615	5476
24		B,50	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	318.52	264	2776
25		B,51	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	338.31	529	4980
26		B,52	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	346.84	339	3499
27		B,53	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	355.26	338	3597
28		B,54	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	362.72	271	2706
29		B,55	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	381.73	475	5063
30		B,56	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	390.09	571	6219
31		B,57	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	398.22	365	3943

Thu Jul 23,2009 03:28PM, BST

Printed by: Sequencer

Page 1 of 2

Applied Biosystems
GeneMapper 4.0

23.07.09

		Dye/Sample Peak	Sample File Name	Size	Height	Area
32		B,58	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	408.0	196	2099
33		B,59	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	424.9	436	4890
34		B,60	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	433.95	435	4870
35		B,61	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	442.66	301	3425
36		B,62	60999 la7-23-09-2-43 PM.fsa	451.62	179	1920

ELECTROFOROGRAMA

AGRADECIMENTOS

Ao Professor Doutor Sérgio Castedo, responsável pela orientação desta dissertação, por todo o rigor científico, acompanhamento, disponibilidade e compreensão.

À equipa do GVPN (Genética Médica e Diagnóstico Pré-Natal) por todo o apoio técnico e emocional.

Não posso deixar de agradecer à Professora Doutora Isabel Marques Carreira pela primeira oportunidade, pelo voto de confiança e pela formação académica e profissional.

Agradeço ainda à minha família:

Ao meu Pai pela revisão exaustiva do trabalho e disponibilidade absoluta e imediata.

À minha Irmã pelo rigor formal, capacidade de tranquilização, apoio moral e emocional, incentivo, amizade e preocupação.

À minha Mãe pela capacidade de resolução imediata de problemas, encorajamento e compreensão, paciência e carinho inesgotáveis.

Ao meu Cunhado pela revisão do trabalho, acompanhamento e aconselhamento.

Aos meus sobrinhos, pela simples presença...